

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1961

N°

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
DIPLOME D'UNIVERSITÉ

PAR

Panayotis LIACOPOULOS
Né le 30 nov. 1919 à Carditsa (GRÈCE)

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} juin 1961

L'anaphylaxie passive
« in vitro »

Président : M. P. MILLIEZ, Professeur

MASSON ET C^{ie} ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e
===== 1963 =====

FACULTÉ DE MÉDECINE DE PARIS

ANNÉE 1961

N°

THÈSE
POUR LE
DOCTORAT EN MÉDECINE
DIPLOME D'UNIVERSITÉ

PAR

Panayotis LIACOPOULOS
Né le 30 nov. 1919 à Carditsa (GRÈCE)

Présentée et soutenue publiquement le 1^{er} juin 1961

L'anaphylaxie passive
« in vitro »

Président : M. P. MILLIEZ, Professeur

MASSON ET C^{ie} ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS, VI^e

1963



PROFESSEURS HONORAIRES :

MM. AUBIN (A.), BÉNARD (H.), BULLIARD (H.), CADENAT (F.), CHABROL (E.), CHAMPY (C.)
DEBRÉ (R.), GASTINEL (P.), GUILLAIN (G.), HALPHEN (E.), HAZARD (R.), HEUYER (G.), LAN-
TUEJOUL (P.), LAROCHE (G.), LÉVY-SOLAL (E.), LIAN (C.), LOEPER (M.), MARION (G.), MAT-
THIEU (P.), MOCQUOT (P.), MONDOR (H.), MONOD (R.), MOREAU (R.), OLIVIER (E.), PASTEUR
VALLERY-RADOT, PETIT-DUTAILLIS, RICHET (C.), STROHL (A.), TANON (L.).

Doyen..... LÉON BINET.
Membre de l'Institut
Assesseur Jean VERNE.

I. — PROFESSEURS

	MM.
Anatomie.....	DELMAS (A.)
Anatomie pathologique.....	DELARUE (J.)
Anesthésiologie.....	BAUMANN (J.)
Biochimie médicale.....	JAYLE (M. F.)
— (Prof. à titre personnel).....	ETTORI (J.)
— (Prof. à titre personnel).....	SCHAPIRA (G.)
Biologie appliquée à l'Éducation physique et aux Sports.....	CHAILLEY-BERT (P.)
Biologie médicale.....	FAUVERT (R.)
— (Prof. à titre personnel).....	BOURLIÈRE (F.)
Cancérologie médicale et sociale.....	BERNARD (J.)
Clinique carcinologique chirurgicale (Necker).....	REDON (H.)
Clinique cardiologique (Broussais).....	MOUQUIN (M.)
— Beaujon.....	SICARD (A.)
— Cochin.....	N.
— Hôtel-Dieu.....	PATEL (J.)
— Pitié.....	CORDIER (G.)
— Saint-Antoine.....	GOSSET (J.)
— Salpêtrière.....	MOULONGUET (P.)
— Tenon.....	LORTAT-JACOB (J.-L.)
Clinique de chirurgie infantile et orthopédique (Enfants-Malades).....	FÈVRE (M.)
Clinique chirurgicale orthopédique et réparatrice (Cochin).....	MERLE D'AUBIGNÉ (R.)
Clinique de chirurgie cardio-vasculaire (Broussais).....	GAUDART-D'ALLAINES (F. de)
Clinique de chirurgie pleuro-pulmonaire (Laënnec).....	MATHEY (J.)
Clinique endocrinologique (Pitié).....	DECOURT (J.)
Clinique de génétique médicale (Enfants-Malades).....	LAMY (M.)
Clinique gynécologique (Broca).....	FUNCK-BRENTANO (P.)
Clinique des maladies cutanées et syphilitiques (St-Louis).....	DEGOS (R.)
Clinique des maladies des enfants (Enfants-Malades).....	CATHALA (J.)
Clinique des maladies infectieuses (Claude-Bernard).....	MOLLARET (P.)
Clinique des maladies mentales et de l'encéphale (Ste-Anne).....	DELAY (J.)
Clinique des maladies métaboliques (Necker).....	HAMBURGER (J.)
Clinique des maladies du sang (Broussais).....	MARCHAL (G.)
Clinique des maladies du système nerveux (Salpêtrière).....	N.
— Boucicaut.....	LENÈGRE (J.)
— Broussais.....	SOULIÉ (P.)
— Cochin.....	JUSTIN-BESANÇON (L.)
— Cochin.....	BROUET (G.)
— Hôtel-Dieu.....	BARIÉTY (M.)
— Pitié.....	DREYFUS (G.)
— St-Antoine.....	KOURILSKY (R.)
Clinique médicale d'hydrologie thérapeutique et climatologie (Bichat).....	DEBRAY (C.)
Clinique médicale propédeutique (Broussais).....	GENNES (L. de)
Clinique médico-sociale du diabète sucré et des maladies de nutrition (Hôtel-Dieu).....	DEROT (M.)
Clinique de neuro-chirurgie (Pitié).....	DAVID (M.)
Clinique neurologique (Salpêtrière).....	GARCIN (R.)
— Baudelocque.....	LACOMME (M.)
— Foch (Suresnes).....	MERGER (R.)
Clinique obstétricale et gynécologique (Port-Royal).....	VARANGOT (J.)
Clinique ophtalmologique (Hôtel-Dieu).....	RENARD (G.)
Clinique oto-rhino-laryngologique (Lariboisière).....	AUBRY (M.)
Clinique de pédiatrie et de puériculture (St-Vincent-de-Paul).....	LELONG (M.)
Clinique de pédiatrie Sociale (Enfants-Malades).....	MARIE (J.)
Clinique de pneumo-ptysiologie (Laënnec).....	BERNARD (E.)
Clinique psychiatrique infantile (Salpêtrière).....	MICHAUX (L.)
Clinique de rhumatologie médicale et sociale (Cochin).....	COSTE (F.)
Clinique stomatologique (Pitié).....	DECHAUME (M.)
Clinique thérapeutique chirurgicale (Vaugirard).....	N.
Clinique thérapeutique médicale (St-Antoine).....	LEMAIRE (A.)
Clinique urologique (Cochin).....	N.

Embryologie	GIROUD (A.)
— (Prof. à titre personnel).....	TUCHMANN-DUPLESSIS (H.)
Histoire de la médecine et de la chirurgie (Lariboisière).....	SÈZE (S. de)
Histologie.....	VERNE (J.)
Hygiène et clinique de la première enfance (Trousseau)	TURPIN (R.)
Hygiène et médecine préventive	JOANNON (P.)
— (Prof. à titre personnel)	DEPARIS (M.)
Médecine du Travail	DESOILLE (H.)
Médecine légale	PIÉDELIÈVRE (R.)
Microbiologie (Bactériologie et virologie).....	FASQUELLE (R.)
Parasitologie.....	GALLIARD (H.)
— (Prof. à titre personnel)	BRUMPT (L. C.)
Pathologie chirurgicale	COUVELAIRE (R.)
— (Prof. à titre personnel)	LAURENCE (G.)
Pathologie exotique.....	LAVIER (G.)
Pathologie expérimentale et comparée.....	MERKLEN (F.-P.)
Pathologie médicale	MILLIEZ (P.)
Pathologie respiratoire.....	TURIAF (F.)
Pathologie et thérapeutique générales	BOUDIN (G.)
Pharmacologie.....	CHEYMOL (J.)
— (Prof. à titre personnel)	LÉVY (M ^{me} J.)
Physiologie	BINET (L.)
— (Prof. à titre personnel)	BARGETON (D.)
— (Prof. à titre personnel)	PARROT (J.)
Physiologie et pathologie obstétricale	LEPAGE (F.)
Physique médicale.....	DOGNON (A.)
— (Prof. à titre personnel)	DJOURNO (A.)
Radiologie médicale.....	DESGREZ (H.)
Technique chirurgicale et Chirurgie expérimentale	LÉGER (L.)
Thérapeutique	CONTE (M.)

II. — PROFESSEURS SANS CHAIRE, PROFESSEURS AGRÉGÉS ET MAÎTRES DE CONFÉRENCES - AGRÉGÉS

MM.		MM.	
Anatomie	{ CABROL (C.) COUINAUD (C.) OLIVIER (G.)	Médecine légale.....	{ DEROBERT (L.) pr. s. ch. HADENGUE (A.) FOURNIER (E.)
Anatomie pathologique.....	{ GAUTHIER - VILLARS (M ^{me} P. pr. s. ch.) BUSSER (F.) GOUYGOU (Ch.) ORCEL (L.) PAILLAS (J.)	Médecine du travail ..	{ GUENIOT (M.) ALBAHARY (C.) LHERMITTE (F.)
Anesthésiologie	{ VOURC'H (G.)	Neurologie	{ GRANJON (A.) HERVET (E.) LE LORIER (G.)
Bactériologie	{ BARBIER (P.) CHRISTOL (D.) TOURNIER (P.)	Obstétrique	{ MORIN (P.) MUSSET (R.) ROBEY (M.) THOYER-ROZAT (J.)
Biochimie médicale...	{ DESGREZ (P.), pr.s.ch POLONOSKI (J.), m. de conf.	Ophtalmologie.....	{ BRÉGEAT (P.) SARAUX (H.) JUDET (R.)
Biologie appliquée à l'Éducation Physique et aux Sports.	PLAS (F.)	Orthopédie.....	{ RAMADIER (J.)
Carcinologie.....	{ DENOIS (P.) MATHE (G.)	Oto-rhino-Laryngologie	{ DEBAIN (J.) CHABAUD (A.) BARCAT (J.)
Dermato-Syphili-graphie	DUPERRAT (B.)	Parasitologie	{ BINET (J.-P.) CAUCHOIX (J.) CHATELIN (C.-L.) DUBOST (Ch.) DUBOST (Cl.)
Électro-Radiologie ...	LEDOUX-LEBARD (G.)	Pathologie chirurgicale	{ FAUREL (J.) FLABEAU (F.) GERMAIN (A.) LOYGUE (J.) MERCADIER
Hématologie.....	{ BILSKI-PASQUIER (G.) DAUSSET (J.)	Pathologie exotique..	{ PERROTIN (J.) ROBERT (H.) THOMERET (G.) SCHNEISDER (J.)
Histologie.....	{ COUJARD (R.) pr. s. ch. MAROIS (M.) RACADOT (J.)	Pathologie expérimentale	{ GROSNIER (J.) HARTMANN (L.) LÉPER (J.) MAURICE (J.) RICHET (G.)
Hydrologie.....	CORNET (A.)		
Hygiène	{ BOYER (J.), pr.s.ch. CORRE-HURST (M ^{me} L.)		
Maladies infectieuses..	{ BASTIN (R.) DUPONT (V.)		

	MM.		MM.
Pathologie médicale..	AUSSANNAIRE (M.)	Pédiatrie-Puériculture	{ JOSEPH (R.)
	BOUR (H.)		{ MANDE (R.)
	BOUVIER (J.)		{ MOZZICONACCI (P.)
	BOUVRAIN (Y.)		{ POLONOVSKI (C.)
	BRICAIRE (H.)		{ ROSSIER (A.)
	BRISSAUD (H.)		{ BOISSIER (J.)
	BROCARD (H.)		{ LECHAT (P.)
	BUGE (A.)		{ DEJOURS (P.)
	CASTAIGNE (P.),		{ GOUGEROT (L.), m.
	m. conf.		{ conf. pr. s. ch.
	CATINAT (J.)		{ KELLERSHOHN
	CONTAMIN (F.)		{ KREIS (B.)
	COURY (C.)		{ PICHOT (P.)
	FREZAL (J.)		{ DUCHÉ (D.)
	HOUSSET (E.)		{ DELBARRE (F.)
	LAROCHE (Cl.)		{ CERNÉA (P.)
	LESOBRE (R.)		{ CHAPUT (M ^{me} A.),
	MACREZ (O.)		{ m. c. agr.
Pneumophtisiologie...	NICK (J.)	Stomatologie.....	{ GRELLET (M.)
	PEQUIGNOT (H.)		{ CHASSAGNE (P.)
	pr. s. ch.		{ LAMOTTE (M.).
	ROYER (P.)		{ QUENU (L.)
	WOLFROMM (R.)		
Physiologie		Thérapeutique.....	
Physique médicale...		Urologie	

III. — PROFESSEURS SANS CHAIRE ET AGRÉGÉS CHARGÉS DE COURS DE CLINIQUE ANNEXE à titre permanent.

	MM.		MM.
Anatomie	DEBEYRE	Clinique obstétricale..	{ GRASSET (J.)
Clinique chirurgicale ..	ABOULKER (P.)		{ MAYER (M.)
	AMELINE (A.), pr.		{ RAVINA (J.)
	s. ch.		{ DESVIGNES (P.)
	HUGUIER (J.)		{ OFFRET (G.)
	OLIVIER (C.)	Clinique ophtalmo- logique	
	PADOVANI (P.)		
	POILLEUX (F.)		
	ROUX (M.)		
	VERNE (J.-M.)		
	DOMART (A.)		
	PERRAULT (M.)		
	RAMBERT (P.)		
	THIEFFRY (S.)		
Clinique médicale ...		Clinique oto-rhino- laryngologique	
Clinique médicale ...		Clinique pédiatrique et puériculture	
Clinique médicale ...		Clinique psychiatrique	
Clinique médicale ...		Clinique urologique ...	
Clinique médicale ...		Médecine légale.....	

IV. — PROFESSEURS DÉTACHÉS DANS LES UNIVERSITÉS ÉTRANGÈRES

Bactériologie.....	HAUDUROY (P.) Pr. s. ch.
Pathologie chirurgicale	RUDLER (J.) Pr. s. ch.

V. — CHARGÉS DE COURS D'HYGIÈNE SCOLAIRE ET UNIVERSITAIRE BOLTANSKI (E.), LAUNAY (C.).

Secrétaire général de la Faculté	M. LENA (J.)
Secrétaires.....	M ^{me} BEURLAND (H.), M ^{lle} CHAINTREUIL (G.), M ^{me} ROCHE (L.)
Conservateur en Chef	M. le Docteur HAHN (A.)
Conservateur.....	M ^{lle} DUMAIRE (P.)
Bibliothécaires	{ M ^{mes} CONTET (J.), FORGET (F.)
	{ M ^{lles} LAURENT (H.), LE NOIR (G.), QUIÉVREUX (E.).

A MES PARENTS

A MA FEMME

ma collaboratrice.

A MES BEAUX-PARENTS

A Monsieur le Professeur L. PASTEUR VALLERY-RADOT,

Professeur honoraire à la Faculté de Médecine de Paris,
Membre de l'Académie Française,
Membre de l'Académie Nationale de Médecine,
Grand Officier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a fait le grand honneur de nous accueillir
dans son Service et de nous prodiguer un précieux enseignement.

Nous tenons à lui exprimer notre profonde reconnaissance pour le soutien inestimable qu'il nous a apporté en maintes occasions et pour la confiance qu'il n'a cessé de nous témoigner.

A notre Président de Thèse,

Monsieur le Professeur P. MILLIEZ,

Professeur de Pathologie Médicale à la Faculté de Médecine
de Paris,

Officier de la Légion d'Honneur,

Médaille de la Résistance avec rosette,

Médecin de l'Hôpital Beaujon,

Qui nous a fait l'honneur de bien vouloir accepter
la présidence de cette thèse.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre
gratitude pour l'enseignement clinique que
nous avons reçu auprès de lui.

A Monsieur le Professeur B. N. HALPERN,

Professeur au Collège de France,
Directeur de Recherches au Centre National
de la Recherche Scientifique,
Chef de Laboratoire à la Faculté de Médecine,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui, après nous avoir accueilli dans son laboratoire, n'a cessé de guider notre travail avec ses conseils éclairés, son intérêt constant et son amicale sollicitude. Nous devons à son éminente compétence scientifique notre formation de chercheur, au cours des années passées auprès de lui, et la réalisation de cette thèse. Pour tout ce qu'il nous a prodigué, nous lui exprimons ici notre admiration, notre profonde reconnaissance et notre respectueuse affection.

A Monsieur le Professeur Agrégé R. WOLFROMM,

Médecin de l'Hôpital Rothschild,
Chevalier de la Légion d'Honneur,

Qui nous a initié à la Médecine Française et nous a guidé dans l'élaboration de plusieurs travaux, avec sa compétence et sa constante cordialité. Son amitié, toujours présente, nous a soutenu et encouragé à chaque moment difficile.

A tous nos remerciements, nous joignons l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre affection dévouée.

A Monsieur R. BINAGHI,
Docteur ès Sciences Chimiques
A Monsieur le Docteur B. BIOZZI,
A Monsieur le Docteur G. LAGRUE,
A Mademoiselle Cl. STIFFEL,
Docteur ès Sciences
A Mademoiselle Th. NEVEU,
Docteur ès Sciences
A Monsieur Cl. CAVELIER,
A Madame Ch. MARTIAL-LASFARGUES,
A Madame J. PARLEBAS,
A Mademoiselle M. Cl. BIDART,
A Mademoiselle A. FRAY,
A Mademoiselle D. MOUTON,
A Mademoiselle A. BRANELLEC,
A Mademoiselle M. F. PERRAMANT,

Avec qui nous formons au Laboratoire une équipe
unie par un intérêt scientifique commun, mais
aussi par des liens d'amitié qui ne se sont jamais
relâchés et dont nous éprouvons constamment
la réconfortante fidélité.

L'ANAPHYLAXIE PASSIVE

IN VITRO

Introduction

L'étude extensive de l'anaphylaxie depuis sa découverte par PORTIER et RICHET (1902) a permis d'établir qu'elle est un phénomène biologique s'étendant à toutes les espèces animales supérieures et se confondant chez l'Homme avec l'allergie découverte par v. PIRQUET (1906). De plus, elle a permis la description détaillée des manifestations qui caractérisent le choc anaphylactique chez les différents animaux et chez l'Homme, ainsi que l'aspect clinique que revêtent ses formes localisées ou atténuées (phénomène d'Arthus, maladies allergiques, maladie du sérum).

Mais la portée de cette étude descriptive était forcément limitée. Le mécanisme intime de l'anaphylaxie serait resté obscur si M. NICOLLE (1907), OTTO (1907) et DOERR (1909) n'étaient parvenus à démontrer la possibilité de la transmission passive de l'anaphylaxie d'un animal à l'autre. Cette découverte a permis de classer l'anaphylaxie dans le domaine plus général de l'immunologie et d'établir que le facteur déterminant en étaient les anticorps. Ainsi, l'étude de l'anaphylaxie passive constitue un pas en avant dans la connaissance du mécanisme intime de la réaction anaphylactique. Son extension à l'Homme a permis à PRAUSNITZ et KÜSTNER (1921) de mettre au point la réaction qui porte leur nom et qui reste encore aujourd'hui le moyen le plus sûr pour établir le caractère allergique d'une manifestation morbide chez l'Homme. KABAT et ses collaborateurs, dans une série de travaux sur l'anaphylaxie passive du Cobaye (1942 à 1949) ont précisé les aspects quantitatifs de l'anaphylaxie passive générale, tandis que OVARY (1950 à 1960) a tiré toute une série d'informations importantes de l'anaphylaxie cutanée passive.

* * *

L'anaphylaxie passive des tissus ou des organes isolés *in vitro* constitue incontestablement un nouveau moyen susceptible de permettre une étude plus approfondie et plus minutieuse des phénomènes d'hypersensibilité.

Cette méthode consiste à sensibiliser passivement à l'aide d'un immunosérum un tissu isolé *in vitro* et à déclencher ensuite, par l'addition de l'antigène spécifique, la réaction anaphylactique que l'on enregistre soit par la réponse du tissu même, soit par la quantité d'histamine libérée dans le milieu de survie du tissu.

La sensibilisation passive *in vitro* présente de notables avantages sur l'anaphylaxie passive *in vivo*. Elle offre, en effet, la possibilité de varier les conditions expérimentales à une échelle irréalisable *in vivo*. Il a été ainsi possible non seulement d'établir les aspects quantitatifs et la cinétique du phénomène de la sensibilisa-

tion sur des tissus isolés de l'organisme, mais aussi d'étudier l'influence de certains facteurs physiques ou chimiques, tels que le pH , la force ionique, la température, la présence de protéines non spécifiques, etc., sur le processus de la sensibilisation. Elle a permis également de révéler les conditions dans lesquelles la sensibilisation peut être activée ou, au contraire, inhibée. Cette technique a servi, en outre, pour établir certains rapports quantitatifs entre les anticorps et l'antigène lors du déclenchement de la réaction anaphylactique.

Ainsi, l'étude de l'anaphylaxie passive *in vitro* constitue un nouveau progrès dans la connaissance du mécanisme intime de l'hypersensibilité du type immédiat. Néanmoins, cette méthode, comme toute technique, connaît des limites qu'il convient de signaler dès maintenant :

1° La sensibilisation passive *in vitro* n'est réalisable qu'avec des anticorps de certaines espèces animales et le tissu de Cobaye choisi doit pouvoir soit répondre par une contraction à la réaction anaphylactique, soit libérer une quantité importante d'histamine.

2° Il existe dans l'aptitude d'un organe à se sensibiliser, des différences individuelles non seulement d'un animal à l'autre, mais aussi entre les diverses parties d'un même organe. Mais ces écarts ne sont pas importants et, en multipliant les essais de chaque expérience, on peut obtenir des moyennes valables.

3° La survie de l'organe isolé dans le milieu artificiel étant réduite à quelques heures, il n'a pas été possible d'étudier avec précision certains phénomènes se déroulant très lentement, notamment la sensibilisation avec des doses minimales d'anticorps ou la possibilité de désensibilisation après une élution très prolongée.

4° En raison d'une interférence entre les anticorps et les gamma-globulines non spécifiques, la sensibilisation est malaisée avec des immunosérums pauvres en anticorps. Pour la même raison, il n'a pas été possible, faute de disposer d'anticorps purs, de préciser la quantité minimum d'anticorps qui permet de sensibiliser un tissu.

Malgré ces restrictions, la technique de la sensibilisation passive *in vitro* offre de larges possibilités et permet de compléter les connaissances obtenues par l'anaphylaxie active et l'anaphylaxie passive *in vitro*.

TRAVAUX ANTÉRIEURS.

La possibilité de sensibiliser *in vitro* un organe a été signalée dès 1913 par DALE. Cet auteur a montré que la mise en contact d'une corne utérine de Cobaye avec un immunosérum de Cobaye antisérum de Cheval, confère à cet organe la propriété de réagir par une contraction spécifique à l'addition de l'antigène. Mais la sensibilisation passive *in vitro*, d'après cet auteur, ne peut être réalisée que si on emploie des organes prélevés sur un animal sensibilisé. Après le déclenchement de la réaction anaphylactique par l'antigène correspondant, ces organes incubés pendant quelques heures dans un immunosérum de Cobaye, se sensibilisent à nouveau

et réagissent au contact de l'antigène. En dehors de cette « resensibilisation » DALE n'a pas pu sensibiliser *in vitro* des organes de cobayes normaux. Néanmoins, en 1939, HARTLEY, un élève de DALE, a montré que la sensibilisation de la corne utérine peut s'effectuer *in vitro* et même à des températures basses (5°C).

En 1943, KULKA, reprenant les expériences de DALE, a montré qu'avec des sérums riches en anticorps, la sensibilisation *in vitro* peut être obtenue en quelques minutes. De ces expériences, KULKA acquiert l'impression qu'il pourrait exister une certaine relation entre la concentration du sérum en anticorps et la durée nécessaire d'incubation, mais il n'en apporte pas de preuves.

En 1956, PASTEUR VALLERY-RADOT, HALPERN et leurs collaborateurs ont sensibilisé *in vitro* des fragments d'intestin de Cobaye avec un sérum de Lapin anti-ovalbumine et ils ont montré que l'intensité de la sensibilisation mesurée par la hauteur de la contraction spécifique est en rapport avec le temps d'incubation. En 1959, NIELSEN et coll. montrent qu'après une sensibilisation de l'iléon de Cobaye *in vitro* avec un immunosérum de Lapin, l'addition de l'antigène provoque une contraction anaphylactique dont l'importance dépend de la quantité d'anticorps adsorbée sur le tissu.

Tout récemment, et tandis que nous poursuivions nos recherches, MONGAR et SCHILD (1960) ont publié une étude sur les modalités de la sensibilisation passive *in vitro*. Ces auteurs utilisent des tranches de poumons de Cobaye qu'ils sensibilisent avec un antisérum de Lapin, et par dosage des quantités d'histamine libérés après addition de l'antigène spécifique, ils analysent la cinétique de la sensibilisation passive et l'influence de divers facteurs sur ce phénomène.

Nos recherches personnelles entreprises depuis 1958 ont pour objet d'étudier le problème de la sensibilisation des tissus par des anticorps humoraux. L'ensemble de ces recherches est classé en quatre chapitres : le premier est consacré à la description des techniques, du matériel utilisé et des aspects que revêt la réaction anaphylactique après la sensibilisation *in vitro* de divers tissus et organes de cobayes ; dans le deuxième sont rapportées les modalités et la cinétique de la sensibilisation *in vitro* ainsi que nos expériences sur les facteurs qui interfèrent avec le processus de la sensibilisation ; dans le troisième chapitre, nous exposons les essais de désensibilisation que nous avons faits en vue d'étudier la réversibilité du phénomène de la sensibilisation tissulaire ; et, dans le quatrième chapitre, nous signalons les rapports quantitatifs entre anticorps et antigène, qui semblent nécessaires dans les tissus pour le déclenchement ou l'inhibition de la réaction anaphylactique.

L'Anaphylaxie passive *in vitro*

I. — La méthode de sensibilisation *in vitro* *

PAR

P. LIACOPOULOS

[Centre de Recherches Allergiques et Immunologiques
(C.N.R.S., Institut National d'Hygiène et Association Claude-Bernard).
Directeur : Pr B. N. Halpern (1)].

L'anaphylaxie passive *in vitro* constitue une méthode simple et précise d'étude de l'anaphylaxie. Elle permet, en effet, de sensibiliser passivement, à l'aide d'un immunosérum, un tissu isolé et de déclencher ensuite la réaction anaphylactique, par l'addition de l'antigène spécifique dans le milieu de survie. L'importance de cette réaction, que l'on peut évaluer soit par le dosage de l'histamine libérée, soit par l'enregistrement direct de la réponse du tissu, permet d'étudier quantitativement le processus de la sensibilisation anaphylactique.

Dès 1913, DALE signale qu'il est possible de sensibiliser *in vitro* une corne utérine de Cobaye avec un immunosérum homologue antisérum de Cheval. Un élève de DALE, HARTLEY (1939) montre que la sensibilisation de la corne utérine peut s'effectuer *in vitro*, même à des températures basses (5°C). KULKA (1943) rapporte qu'avec des sérums riches en anticorps, la sensibilisation *in vitro* peut être obtenue en quelques minutes. PASTEUR VALLERY-RADOT, HALPERN et leurs collaborateurs (1956) sensibilisent *in vitro* des fragments d'intestin de Cobaye avec un sérum de Lapin anti-ovalbumine et montrent que l'intensité de la sensibilisation, mesurée par la hauteur de la contraction spécifique, est en rapport avec le temps d'incubation du tissu dans la solution contenant les anticorps.

La sensibilisation passive *in vitro* présente de notables avantages sur l'anaphylaxie passive *in vivo* pour l'étude du mécanisme de sensibilisation tissulaire. Elle offre, en effet, la possibilité de faire varier les conditions expérimentales à une échelle irréalisable *in vivo*. Ainsi, cette méthode permet

* Reçu le 30 juin 1961.

(1) Hôpital Broussais, 96 rue Didot, Paris (14^e).

d'étudier la cinétique du phénomène de sensibilisation, et l'influence de divers facteurs physiques et chimiques capables d'activer, ou au contraire d'inhiber, la sensibilisation. Elle permet également d'établir si ce phénomène est réversible et dans quelles conditions.

Dans ce travail, nous nous bornerons à décrire la méthode de la sensibilisation passive *in vitro*, et à rapporter les aspects de la réaction anaphylactique de divers organes de Cobaye, sensibilisés passivement *in vitro*.

TECHNIQUES

Principe : la technique employée est relativement simple : elle consiste à immerger un fragment de tissu à muscle lisse de Cobaye dans une solution de Tyrode oxygénée, maintenue à la température de 38°C et contenant un immunsérum à une concentration adéquate. Après une durée de contact convenablement choisie, l'organe est retiré et placé dans une solution normale de Tyrode. La préparation est lavée à plusieurs reprises. L'addition de l'antigène provoque alors une libération d'histamine qui se manifeste, dans le cas de l'organe à muscles lisses, par une contraction. Cette réaction est spécifique pour un système donné antigène-immunsérum.

Cette technique comporte divers éléments que nous allons examiner successivement :

1. — *Les tissus employés* : au cours de cette étude sur la sensibilisation passive *in vitro*, nous avons employé plusieurs organes de Cobaye à muscles lisses : iléon, corne utérine, poumons, vésicule biliaire. Parmi ces organes, l'iléon de Cobaye nous a paru être l'organe le plus approprié pour ces essais.

Cependant, pour vérifier le caractère général de cette méthode nous avons étendu notre étude à d'autres organes à muscles lisses. Nous avons ainsi constaté qu'il est aussi aisé de sensibiliser *in vitro* la corne utérine de Cobaye, organe employé par DALE (1913) et par HARTLEY (1939).

Les poumons de Cobaye isolés et perfusés selon la technique de BHATTACHARYA et DELAUNOIS (1955) peuvent être sensibilisés par perfusion avec un immunsérum de Lapin, riche en anticorps. La réaction anaphylactique se traduit par un bronchospasme violent lors de l'introduction de l'antigène dans le liquide de la perfusion.

De même la vésicule biliaire de Cobaye se sensibilise aisément *in vitro* et elle réagit par une contraction après l'addition de l'antigène.

Cette liste d'organes n'est guère limitative. Nous pensons que tous les organes, susceptibles de répondre par une réaction anaphylactique après sensibilisation *in vivo* peuvent être sensibilisés avec autant de succès *in vitro*.

La contraction anaphylactique n'est qu'une expression de la réaction antigène-anticorps, propre aux organes à muscles lisses. Lorsqu'on utilise des tissus entiers ou en tranches, la réaction anaphylactique se manifeste par la libération et la diffusion d'histamine dans le milieu de survie. Nous avons ainsi sensibilisé *in vitro* des diaphragmes de Cobaye avec des anticorps de Lapin. En employant des tranches de poumons de Cobaye, MONGAR et SCHILD (1955 à 1960) ont étudié le mécanisme de la réaction anaphylactique.

3. — *Matériel utilisé* : l'appareil que nous utilisons est celui qui a été décrit par HALPERN (1942). Il comporte deux cuves en verre plongées dans un bain-marie à température réglée à 38°C. Ces cuves sont en communication avec un flacon contenant du liquide de Tyrode. Une seconde communication est assurée avec un appareil d'aspiration pour la vidange des cuves. Un tube en verre est suspendu à l'intérieur de chaque cuve et sert à la fois pour attacher l'organe et pour oxygéner continuellement le milieu de survie. L'organe isolé est attaché par l'une de ses extrémités à ce tube de verre et par l'autre au levier inscripteur à

inscription frontale, qui enregistre les contractions de l'organe sur un tambour, tournant à la vitesse choisie.

Les conditions de sensibilisation dans les deux cuves sont soit identiques, ce qui permet de faire une expérience en double, soit différentes et, en ce cas, dans la première cuve nous établissons des conditions toujours identiques tandis que dans la deuxième nous faisons varier les conditions. Ainsi il est possible d'étudier l'effet d'une variation donnée sur le processus de la sensibilisation d'un organe isolé, en comparant l'importance de sa contraction anaphylactique avec celle de l'organe placé dans les conditions standards.

4. — *Le milieu de sensibilisation* : la sensibilisation s'effectue dans une solution de Tyrode, maintenue à 38°C, à laquelle on ajoute l'immunsérum à des dilutions variables.

La composition du liquide de Tyrode est la suivante :

ClNa	8,0 g
ClK	0,2 g
Cl ₂ Ca (2 H ₂ O)	0,2 g
Cl ₂ Mg (6 H ₂ O)	0,1 g
PO ₄ H ₂ Na	0,05 g
CO ₃ HNa	1 g
Glucose	1 g
Atropine	30 µg
Eau distillée	1000 cm ³

Le pH de cette solution, en équilibre avec l'air, est de 7,8 à 8,2. La température est généralement à 38°C, mais une série d'expériences a été faite à des températures plus basses ou plus élevées.

Dans certains cas nous avons réalisé des expériences dans un milieu dépourvu d'électrolytes et dont le support osmotique a été assuré soit par un ose (dextrose, lévulose, saccharose, lactose), soit par un acide aminé (glycocolle, alanine, etc...).

5. — *Le milieu de la réaction anaphylactique* : quelles que soient les conditions de la sensibilisation, la réaction anaphylactique a toujours été déclenchée après que l'on eut remplacé l'organe dans une solution normale de Tyrode, oxygénée et maintenue à 38°C.

Après la période de sensibilisation, et surtout lorsque le milieu de sensibilisation a été très différent de la normale, l'organe doit être soumis à de nombreux lavages avec de la solution de Tyrode, avant que sa réactivité ne revienne aux valeurs normales. En tout cas, l'étalonnage de l'organe avec une solution connue d'histamine permet de vérifier, avant de déclencher la réaction anaphylactique, que l'organe a retrouvé sa sensibilité normale à l'histamine.

6. — *Les anticorps* : depuis les travaux de WEIL (1913) on sait que le Cobaye se sensibilise promptement avec les anticorps de Lapin. D'autre part, le Lapin produit des immunsérums beaucoup plus riches en anticorps que le Cobaye. Nous avons utilisé ainsi, dans la plupart de nos expériences, des immunsérums de Lapin, anti-ovalbumine de Poule, antisérumalbumine de Bœuf, et anti-poly-saccharide extrait de pneumocoque S III.

Les animaux ont été sensibilisés suivant les diverses techniques classiques : injections intraveineuses ou intrapéritonéales répétées de l'antigène précipité avec l'alun, ou injections sous-cutanées ou intramusculaires de l'antigène incorporé dans les adjuvants de FREUND, ou encore en combinant ces deux procédés.

La plupart des immunsérums utilisés avaient un titre d'anticorps assez élevé variant entre 600 et 1 200 µg d'azote d'anticorps par ml. L'immunsérum anti-pneumococcique S III titrait 2,4 mg d'azote d'anticorps par ml.

Dans un grand nombre d'expériences, nous avons utilisé au lieu de l'immunsérum entier, les gamma-globulines précipitées par le sulfate de sodium à 18 p.

100 et redissoutes dans une solution physiologique de NaCl (0,9 p. 100) (THURSTON et coll., 1957). L'emploi des anticorps purifiés s'est imposé dans les essais portant sur la compétition entre les anticorps et les gamma-globulines non spécifiques. Dans d'autres expériences nous avons eu recours à des anticorps marqués à l' ^{131}I suivant la technique de FRANCIS et coll. (1951) afin d'étudier quelques aspects quantitatifs de l'adsorption des anticorps sur des fragments d'intestin sensibilisés, ou de leur élution par des lavages prolongés.

7. — *Les antigènes* : nous avons employé de l'ovalbumine de Poule cristallisée trois fois et préparée au laboratoire, de la sérum-albumine de Bœuf (fraction V de COHN) (2) et du polysaccharide de pneumocoque S III (3).

La quantité d'antigène utilisée pour déclencher la réaction anaphylactique était calculée de façon à être largement en excès par rapport à la dose nécessaire pour saturer les anticorps.

8. — *Mode d'évaluation de la réaction anaphylactique* : afin de pouvoir évaluer l'intensité de la sensibilisation, il fallait trouver une échelle qui permette de l'exprimer. En effet, la sensibilité de diverses préparations présente des variations assez considérables et il est impossible de comparer des réactions successives du même organe, car la réaction anaphylactique n'est pas reproductible sur la même préparation.

Il nous a semblé ainsi que le mode d'évaluation le plus approprié serait d'exprimer l'intensité de la contraction anaphylactique en équivalents histaminiques (bichlorhydrate d'histamine). En pratique, chaque préparation est étalonnée avec de l'histamine avant l'addition de l'antigène. L'importance de la contraction anaphylactique est exprimée par la quantité d'histamine qui provoque une contraction de la même hauteur.

Ce mode d'évaluation de la réaction anaphylactique permet d'établir la cinétique de la sensibilisation d'une préparation avec une concentration donnée d'anticorps : en portant sur les ordonnées les équivalents d'histamine et sur les abscisses le temps d'incubation, nous pouvons construire une courbe qui illustre la vitesse de la sensibilisation de la préparation.

Au cours de très nombreuses expériences réalisées avec cette méthode, nous avons constaté que la sensibilité de la préparation à l'histamine est grossièrement parallèle à la sensibilité anaphylactique. De ce fait nous avons pensé que l'expression de la contraction anaphylactique par l'équivalent histaminique est justifiée et valable.

RÉSULTATS

La sensibilisation des tissus d'un organisme ne se manifeste que par la réaction particulière et spécifique de ces tissus au contact de l'antigène correspondant. En l'absence de ce contact, un tissu sensibilisé ne diffère guère apparemment d'un tissu normal. Il n'existe pas actuellement de méthode capable de mesurer ou même de déceler directement la sensibilisation. Le seul moyen que nous avons pour déceler et évaluer la sensibilisation est de déclencher par l'antigène homologue la réaction anaphylactique.

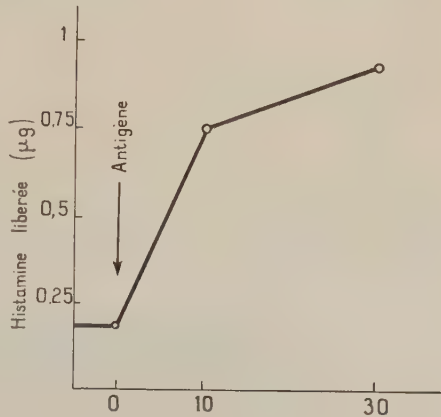
On sait que la réaction anaphylactique, tout au moins chez certaines espèces animales telles que le Chien, le Cobaye, l'Homme, aboutit à la libération d'histamine que l'on peut doser quantitativement, soit dans le sang *in vivo*, soit dans le liquide de survie d'un organe isolé. MONGAR et SCHILD (1960) ont sensibilisé avec un immunosérum de Lapin anti-ovalbumine, des tranches de poumon suspendues dans du liquide de Tyrode. Après l'addition de l'anti-

(2) Préparée par ARMOUR.

(3) SQUIBB.

gène, des quantités dosables d'histamine sont libérées et diffusent dans le liquide de survie. Nous-même avons réussi à sensibiliser *in vitro* le diaphragme de Cobaye à l'aide d'un immunsérum anti-ovalbumine de Lapin. La figure 1 illustre la cinétique de libération d'histamine par ce tissu à la suite de l'addition de l'antigène.

FIG. 1. — Libération d'histamine à la suite de l'introduction de l'antigène (ovalbumine 1 mg) dans le milieu de survie d'un diaphragme isolé de Cobaye sensibilisé *in vitro*. La sensibilisation a été effectuée dans une solution contenant 10 μg N/ml d'anticorps de Lapin pendant deux heures.



Cependant, l'étude du processus de sensibilisation par le dosage direct de l'histamine libérée n'est applicable que pour des réactions anaphylactiques intenses où la quantité d'histamine diffusée dans le liquide de survie est importante. Au cours des réactions anaphylactiques d'intensité moyenne ou faible, la libération d'histamine est minime et difficilement dosable. Or ces réactions moyennes sont les plus intéressantes, car leur intensité varie directement, ainsi que nous allons le voir ultérieurement, avec la quantité d'anticorps qui a sensibilisé le tissu.

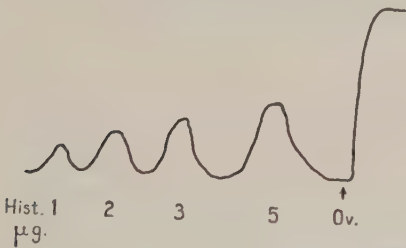


FIG. 2. — Contraction anaphylactique de la vésicule biliaire de Cobaye sensibilisé *in vitro* dans une solution contenant 10 μg N/ml d'anticorps antiovalbumine de Lapin, pendant une heure — Hist. : addition d'histamine (Bichlorhydrate). — Ov. : addition d'ovalbumine (2 mg).

Un autre moyen pour évaluer l'importance de la réaction anaphylactique consiste à enregistrer dans le cas d'un organe à muscles lisses, la contraction produite par l'histamine endogène libérée lors de l'addition de l'antigène. Cette méthode présente l'avantage de pouvoir déceler des réactions anaphylactiques minimales et de permettre l'évaluation quantitative, en équivalents d'histamine, des réactions d'intensité moyenne. Elle permet ainsi d'étudier quantitativement le processus de sensibilisation des organes à muscles lisses, par l'importance de leur contraction anaphylactique.

Ce procédé peut être appliqué à de nombreux organes. Nous allons décrire

l'aspect et les particularités que présente la sensibilisation *in vitro* et la réaction anaphylactique de chacun des organes que nous avons étudiés.

Vésicule biliaire de Cobaye :

Cet organe se sensibilise *in vitro* aisément et répond par une contraction spécifique à l'addition de l'antigène (fig. 2). Mais c'est un organe qui réagit faiblement et lentement à l'histamine et son étalonnage est difficile.

Bronches de Cobaye :

Les poumons prélevés chez l'animal, sous anesthésie générale, sont suspendus dans une chambre hermétiquement fermée et soumis à la respiration artificielle par pression négative. Les poumons sont perfusés à l'aide d'une canule insérée par le ventricule droit dans l'artère pulmonaire et le liquide s'écoule librement, après avoir traversé les poumons, par l'oreillette gauche

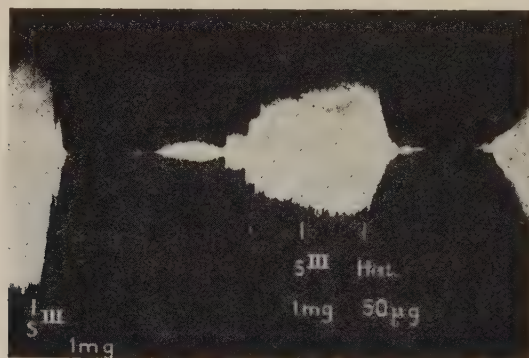


FIG. 3. — Bronchospasme anaphylactique d'un poumon de Cobaye isolé, sensibilisé *in vitro* par perfusion avec une solution contenant 250 μ g N/ml d'anticorps anti-poly-saccharide de pneumocoque S III de Lapin, pendant 15 minutes. — S III : introduction de l'antigène dans le liquide de perfusion. — Hist. : introduction d'histamine (bichlorhydrate).

fendue. La sensibilisation des bronches a été effectuée *in vitro* par l'introduction dans le circuit de perfusion d'un immunosérum de Lapin anti-poly-saccharide de pneumocoque S III durant 20 minutes environ. Immédiatement après l'injection de l'antigène dans le circuit de perfusion, il se produit un bronchospasme violent (fig. 3). Celui-ci ne se produit qu'à la première introduction de l'antigène, une seconde addition d'antigène reste sans résultat. Une injection d'histamine produit un bronchospasme similaire.

Cet organe, ne se prête pas davantage à une étude quantitative du processus de la sensibilisation pour plusieurs raisons : les quantités nécessaires d'anticorps pour obtenir une sensibilisation *in vitro* sont considérables ; pour cette expérience nous avons utilisé 10 cm³ de sérum de Lapin titrant 2,4 mg N anticorps par cm³, soit 24 mg N au total ; en outre, le bronchospasme produit est difficilement mesurable ; de plus, les poumons isolés *in vitro* sont très fragiles, ne supportant aucun changement des conditions standard et l'expérience ne peut durer plus de 30 à 45 mn.

Corne utérine de Cobaye :

L'utérus convient parfaitement à la sensibilisation *in vitro* et cet organe peut même se sensibiliser avec un taux d'anticorps inférieur à celui qui est nécessaire pour l'intestin. Les différents aspects que revêt la sensibilisation passive *in vitro* de l'iléon de Cobaye décrits en détail ci-dessous se retrouvent lorsqu'on emploie la corne utérine. Cependant pour une étude systématique et approfondie du phénomène de la sensibilisation, l'utérus présente quelques inconvénients majeurs, notamment sa tendance à des contractions spontanées, sa sensibilité très variable d'un cobaye à l'autre, et surtout les dimensions de l'organe qui ne permettent qu'un nombre d'essais limité.

Ilion de Cobaye :

Nous allons faire ici une description détaillée des aspects que revêt la réaction anaphylactique sur cet organe (fig. 4), car nous avons choisi cet organe pour l'étude systématique du processus de la sensibilisation.

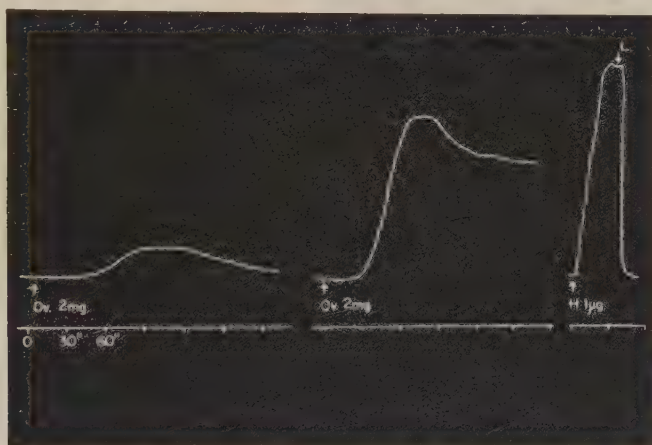


FIG. 4. — Contraction anaphylactique de deux fragments isolés d'intestin isolé de Cobaye, sensibilisés *in vitro* avec deux concentrations différentes d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin. — Ov. : introduction de l'antigène dans le milieu de survie. — H. : introduction de l'histamine (bichlorhydrate). — L. : lavage. — Vitesse de rotation du cylindre rapide

1° Apparition de la contraction anaphylactique.

Comme dans le cas de la sensibilisation active ou passive *in vivo*, la contraction anaphylactique observée après une sensibilisation *in vitro* n'apparaît pas immédiatement après l'addition de l'antigène dans le milieu de survie. Il existe toujours un temps d'attente qui varie entre 15 et 90 secondes. Sa durée dépend de l'intensité de la sensibilisation. Dans les sensibilisations fortes, l'apparition de la contraction anaphylactique est plus précoce que dans les sensibilisations faibles.

2° Forme de la contraction anaphylactique.

Elle dépend essentiellement de l'intensité de la sensibilisation. Si la sensibilisation est faible, la contraction est relativement lente et sa hauteur modé-

rée. Si la sensibilisation est intense, la contraction anaphylactique prend une allure rapide, l'ascension est verticale et sa hauteur maximale.

La contraction, après sa phase ascendante se stabilise, à un certain niveau qui se traduit sur la courbe par la formation d'un sommet ou d'un plateau. La durée totale de la contraction dépend, elle aussi, de l'intensité de la sensibilisation. Lorsque la contraction est de faible amplitude, l'organe se relâche rapidement même si l'antigène n'est pas éliminé par lavage. Lorsque la sensibilisation est intense et la contraction forte, le retour au tonus normal est lent même si l'antigène a été éliminé rapidement après le début de la contraction.

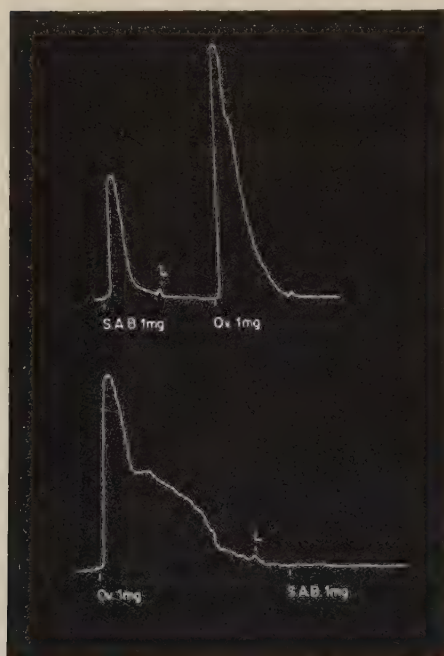


FIG. 5. — Double contraction anaphylactique d'un fragment d'intestin isolé de Cobaye sensibilisé *in vitro* avec un immunosérum de Lapin contenant des anticorps anti-ovalbumine et antisérumalbumine de Bœuf. — Ov. : introduction de l'ovalbumine dans le milieu de survie. — S.A.B. : introduction de la sérumalbumine de Bœuf. — L. : lavage. — La double contraction anaphylactique se produit seulement lorsque les deux antigènes sont introduits dans l'ordre : S.A.B., Ov.

3° Effet d'une seconde addition de l'antigène.

On sait, depuis les travaux classiques de SCHULTZ (1910) et de DALE (1913) qu'une seconde addition d'antigène après la fin de la contraction anaphylactique, n'est généralement pas suivie d'une nouvelle réponse. Ceci est vrai, mais seulement lorsque la première dose d'antigène a été suffisamment grande pour saturer tous les anticorps. Avec une dose d'antigène relativement faible, une seconde contraction anaphylactique peut se produire à la suite d'une deuxième addition d'antigène. Ce phénomène a été mis à profit pour étudier les rapports quantitatifs qui régissent la réaction anaphylactique.

4° Polysensibilisation.

Il est facile de sensibiliser un organe isolé de Cobaye avec deux anticorps différents ou davantage. L'addition de chaque antigène correspondant pro-

voque une réponse spécifique mais à condition que ces réactions soient de faible intensité. Après une contraction maximale, l'intestin ne répond plus à l'autre antigène, introduit après la fin de la contraction anaphylactique (fig. 5). Ce phénomène s'observe également lors d'une double sensibilisation *in vivo* (DALE et HARTLEY, 1916). Cependant, si après la contraction anaphylactique maximale, on laisse au repos l'intestin pendant une heure, l'addition du second antigène produit une deuxième contraction anaphylactique. L'explication de ce phénomène nous échappe.

DISCUSSION

La méthode de sensibilisation passive *in vitro* permet de reproduire, dans des conditions contrôlées, les deux phases qui caractérisent l'anaphylaxie : la sensibilisation tissulaire par des anticorps sériques, et la réaction anaphylactique à la suite de l'union de l'antigène spécifique avec les anticorps qui ont pénétré dans le tissu.

L'anaphylaxie passive *in vitro* est en tout point comparable à l'anaphylaxie passive *in vivo*, et même à l'anaphylaxie active, abstraction faite, bien entendu, de la période de production d'anticorps provoquée par la première pénétration de l'antigène.

a) Nous savons, d'après les travaux de WEIL (1913), qu'une période de latence est nécessaire entre l'injection des anticorps, chez l'animal *in vivo*, et le moment où il est possible de déclencher les symptômes de l'anaphylaxie par l'injection de l'antigène. Cette période est également nécessaire au cours de la sensibilisation *in vitro* et elle correspond au temps d'incubation nécessaire de l'organe isolé avec les anticorps.

b) Après la sensibilisation passive *in vitro*, la contraction anaphylactique ne suit pas immédiatement l'introduction de l'antigène dans le milieu de survie. Suivant l'intensité de la sensibilisation, 15 à 90 secondes s'écoulent avant l'apparition de la contraction anaphylactique. Ce temps est sans doute nécessaire pour la pénétration de l'antigène dans le tissu, son union avec les anticorps et la libération des médiateurs chimiques qui déterminent la contraction musculaire. Le même temps d'attente s'observe également au cours du choc anaphylactique général et de l'épreuve de SCHULTZ (1910) et de DALE (1913).

c) Après la contraction anaphylactique, provoquée par l'introduction d'une dose suffisante d'antigène dans le milieu de survie, une seconde addition d'antigène n'entraîne pas une deuxième contraction anaphylactique, car tous les anticorps tissulaires ont été épuisés par la première dose de l'antigène. Ce phénomène s'observe aussi bien au cours de l'anaphylaxie des organes isolés, passivement sensibilisés *in vitro*, qu'au cours de la réaction anaphylactique des organes prélevés chez des animaux activement ou passivement sensibilisés, et aussi au cours du choc anaphylactique général (dans ce dernier cas, ce phénomène est classiquement appelé tachyphylaxie).

Nous avons rapporté les aspects de la réaction anaphylactique et les modalités de la sensibilisation passive *in vitro* de divers organes de Cobaye. Nous avons retrouvé, dans chaque cas, les mêmes principes généraux exposés

ci-dessus, que la réaction anaphylactique ait été mise en évidence par le dosage de l'histamine libérée dans le milieu de survie, ou par l'enregistrement direct de la contraction anaphylactique. De ces deux procédés, le second nous paraît mieux adapté pour une étude systématique des modalités de la sensibilisation, car il est beaucoup plus sensible et reflète plus fidèlement l'importance de la sensibilisation. En particulier, l'emploi de fragments de l'iléon s'est avéré le plus avantageux pour la suite de cette étude. En effet, il est facile d'étalonner cet organe à l'histamine, et l'importance de sa réaction est, comme nous le verrons ultérieurement, dans une large mesure proportionnelle au degré de sensibilisation. En outre, il supporte relativement bien les variations de température et les modifications du milieu de survie.

Pour ces raisons, dans les travaux qui seront exposés ultérieurement, nous avons utilisé uniquement cet organe.

RÉSUMÉ

— La méthode de sensibilisation passive *in vitro* des organes isolés de Cobaye permet d'obtenir des réactions anaphylactiques en tout point comparables à celles produites après sensibilisation *in vivo* active ou passive.

— L'enregistrement direct de la contraction anaphylactique nous paraît mieux adapté pour l'étude des modalités de la sensibilisation que le dosage de l'histamine libérée au cours de la réaction anaphylactique.

— De tous les organes à muscle lisse étudiés, l'iléon nous paraît présenter les propriétés les plus intéressantes.

SUMMARY

— The *in vitro* method of passive sensitization of isolated organs of guinea pigs enables one to obtain anaphylactic reactions which are in all ways comparable to those obtained after active or passive sensitization *in vivo*.

— The direct recording of the anaphylactic contraction of the sensitized smooth muscle organs appears to us to be better adapted to the study of all the modalities of the sensitization than the measurement of the amount of histamine released in the course of the anaphylactic reaction.

— Of all the smooth muscle organs studied, the ileum appears to present the most interesting properties.

BIBLIOGRAPHIE

- BHATTACHARYA, B. K. et DELAUNOIS, AL. (1955). An improved method for the perfusion of isolated lung of guinea pig. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **101**, 495.
- DALE, H. H. (1913). The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. *J. Pharmacol.*, **4**, 167.
- DALE, H. H. et HARTLEY, P. (1916). Anaphylaxis to the separated proteins of horse serum. *Biochem. J.*, **10**, 408.
- FRANCIS, G. E., MULLIGAN, W. et WORMAL, A. (1951). Labelling of proteins with iodine¹³¹ sulphur³² and phosphorus³⁵. *Nature, London*, **167**, 743.
- HALPERN, B. N. (1942). Les antihistaminiques de synthèse. Essais de chimiothérapie des états allergiques. *Arch. int. Pharmacodyn.*, **68**, 339.

- HARTLEY, P. (1939). Passive sensitization *in vitro*. *Congr. int. Microbiol.*, **3**, 343.
- KULKA, A. M. (1943). Studies on antibody-antigen mixtures. II. The effect of normal living excised tissue and its dependance on the presence of free antibody in the mixture. *J. Immunol.*, **46**, 235.
- MONGAR, J. L. et SCHILD, H. O. (1960). A study on the mechanism of passive sensitization. *J. Physiol., London*, **150**, 546.
- PASTEUR VALLERY-RADOT, L., HALPERN, B. N., BLAMOUTIER, P., BIOZZI, G. et BENACERRAF, B. (1956). Facteurs qui influencent la fixation locale des anticorps dans les tissus. *Congr. Europ. Allergol.*, **3**, 5, Il Pensiero Scientifico, Roma.
- SCHULTZ, W. H. (1910). Physiological studies in anaphylaxis. I. — The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum. *J. Pharmacol.*, **1**, 549.
- THURSTON, J. R., RHEIMS, M. S. et BUEHLER, E. V. (1957). A rapid method for recovering serologically active globulins by sodium sulfate precipitation. *J. Lab. clin. Med.*, **49**, 647.
- WEIL, R. (1913). The nature of anaphylaxis and the relations between anaphylaxis and immunity. *J. med. Res.*, **27**, 497.
-

L'Anaphylaxie passive *in vitro*

II. — Rapports quantitatifs entre anticorps et antigène au cours de l'anaphylaxie passive *in vitro* *

PAR

P. LIACOPOULOS

(Centre de Recherches Allergiques et Immunologiques (1)
[C.N.R.S., Institut National d'Hygiène et Association Claude-Bernard],
Directeur : Pr B. N. Halpern.)

Il est généralement admis qu'un excès d'antigène même très important ne modifie en rien la réaction anaphylactique *in vivo* ou *in vitro*. Par contre une quantité minimale d'antigène paraît nécessaire pour provoquer une réponse totale. Au-dessous de certaines limites, l'intensité de la réaction anaphylactique n'est plus conditionnée par la concentration en anticorps ou par le temps d'incubation, mais par la quantité d'antigène utilisée. KABAT et ses collaborateurs (1942, 1947, 1949) ont montré que, chez des cobayes passivement sensibilisés, la dose déchaînante d'antigène ovalbumine doit être au moins de 20 μg d'azote. Au-dessous de cette quantité, l'intensité du choc anaphylactique s'atténue avec la diminution de la dose d'antigène. MONGAR et SCHILD (1952) ont trouvé que la libération d'histamine par le diaphragme de Cobaye activement sensibilisé s'accroît avec l'augmentation de la concentration en antigène jusqu'à un certain taux. En outre, OVARY (1959) au cours d'expériences sur l'anaphylaxie passive cutanée du Cobaye, a observé qu'une sensibilisation locale avec 1 μg N d'anticorps nécessite l'injection de 0,8 μg N d'antigène (ovalbumine), tandis que pour une sensibilisation avec 0,02 μg N d'anticorps, 10 μg N d'antigène étaient nécessaires pour obtenir une réaction anaphylactique maximale pour chacune des deux concentrations d'anticorps employées.

Il nous a donc paru intéressant de rechercher quelles sont les relations quantitatives entre anticorps et antigène qui régissent la réaction anaphy-

* Reçu le 30 juin 1961.

(1) Hôpital Broussais, 96 rue Didot, Paris (14^e).

lactique. La méthode de l'anaphylaxie passive *in vitro* (LIACOPOULOS, 1961) réalise des conditions qui se rapprochent davantage de celles existant à l'échelon tissulaire. Elle permet d'éviter toutes les difficultés que créent la diffusion et la répartition d'une quantité d'antigène injectée par voie intra-veineuse chez un animal vivant.

A l'aide de cette méthode, nous avons pu préciser quelle est la quantité minimale d'antigène qui est nécessaire pour déclencher une réaction anaphylactique. Nous avons également déterminé quelle est la relation qui relie la quantité d'anticorps utilisée pour sensibiliser un tissu et la quantité d'antigène nécessaire pour le désensibiliser entièrement. Nous avons, en outre, étudié la durée de contact nécessaire avec une faible dose d'antigène pour produire la désensibilisation. Les résultats de l'ensemble de ces expériences, que nous allons décrire ci-dessous, seront ensuite discutés quant à leurs implications théoriques.

TECHNIQUES

Nous avons employé la technique générale de l'anaphylaxie passive *in vitro*, décrite précédemment (LIACOPOULOS, 1961). En particulier, pour cette étude nous avons procédé de la manière suivante : quatre séries de fragments d'intestins isolés sont sensibilisés, dans des milieux contenant respectivement : 2,5 — 5 — 10 et 20 μg N d'anticorps de Lapin anti-ovalbumine par ml, pendant une durée d'incubation uniformément fixée à 30 minutes.

Après la fin de la sensibilisation et l'étalonnage à l'histamine, les fragments d'intestin de chaque groupe ont été immergés dans des solutions d'antigène contenant de 0,016 μg N à 31,7 μg N par ml (exprimé en azote, soit 0,1 à 200 μg d'ovalbumine par ml). A la fin de la réaction anaphylactique et lorsque l'intestin retrouve son tonus normal, l'introduction d'une deuxième dose d'antigène à la concentration de 31,7 μg N par ml (200 μg d'ovalbumine par ml) permettait de contrôler si la première dose avait neutralisé entièrement les anticorps et désensibilisé le fragment d'intestin. En effet, lorsque la première dose est suffisante ou la durée de contact suffisamment prolongée, le tissu se trouve entièrement désensibilisé et une seconde addition d'antigène reste sans effet (tachyphylaxie). Dans le cas contraire, la seconde addition d'antigène provoque une deuxième contraction.

RÉSULTATS

1. Influence de la concentration d'antigène sur la réaction anaphylactique.

La plus faible concentration d'antigène (ovalbumine) qui est capable de déclencher une réaction anaphylactique sur l'iléon de Cobaye sensibilisé *in vitro* avec les concentrations d'anticorps mentionnées, est de l'ordre de 0,016 μg N (0,1 μg d'ovalbumine) par ml. Avec cette concentration d'antigène, la contraction anaphylactique est minime et une grande partie des anticorps reste non saturée ainsi qu'en fait foi l'importance de la contraction résiduelle à la suite de la deuxième addition d'une quantité importante d'antigène (tableau I). Lorsqu'on augmente la concentration de l'antigène, l'intensité des contractions anaphylactiques augmente en relation directe avec la concentration d'antigène utilisée. Mais à partir d'une certaine concentra-

tion d'antigène dont la valeur dépend de la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation, la contraction anaphylactique se stabilise et sa hauteur demeure la même quelle que soit la quantité d'antigène employée (fig. 1).

Ainsi la réaction anaphylactique nécessite une certaine quantité d'antigène. Lorsque celle-ci est infraliminale, la réaction anaphylactique est nulle ; cette réaction s'accroît proportionnellement à la concentration de l'antigène jusqu'à une certaine valeur qui dépend de la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation. Un excès d'antigène, même important, ne modifie plus la réaction anaphylactique.

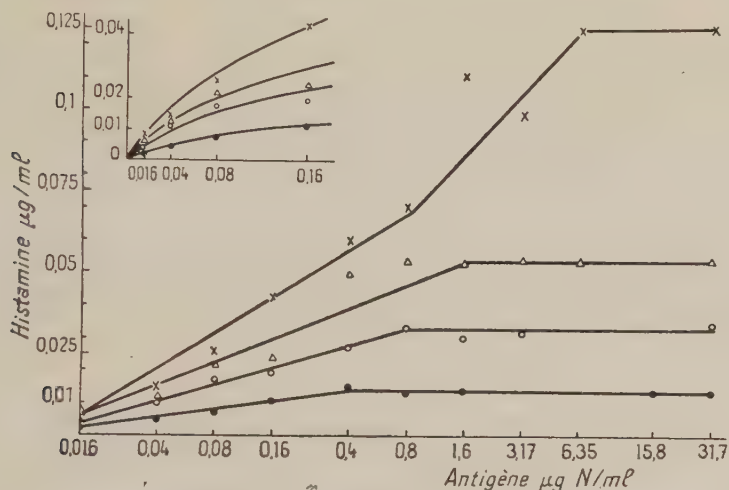


FIG. 1. — Action des concentrations d'antigène sur la contraction anaphylactique de fragments d'iléon de Cobaye sensibilisés *in vitro* avec quatre concentrations différentes d'anticorps : ● 2,5 µg N/ml — ○ 5 µg N/ml Δ 10 µg N/ml × 20 µg N/ml.

Ordonnées : contractions anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate).

Abscisses : concentration d'antigène (échelle logarithmique).

En haut : partie initiale des courbes exprimée en chiffres absolus.

2. Effet d'une concentration d'antigène fixe sur des organes sensibilisés avec des taux d'anticorps variables.

Lorsque la réaction anaphylactique est déclenchée avec un excès d'antigène, son intensité est proportionnelle à la concentration en anticorps pour une durée égale de sensibilisation. Ainsi, pour des concentrations d'anticorps variant de 2,5 µg N/ml à 20 µg N/ml, c'est-à-dire de 8 fois, les contractions obtenues avec une concentration d'antigène de 31,7 µg N/ml (200 µg d'ovalbumine/ml) varient, exprimées en équivalents histaminiques, de 0,014 µg à 0,125 µg d'histamine/ml soit de 9,1 fois (tableau I).

Mais en utilisant des quantités d'antigène très faibles, voisines de la dose liminaire : 0,016 µg N, 0,04 µg N et 0,08 µg N par millilitre, nous constatons que les contractions anaphylactiques des fragments d'iléons sensibilisés avec les concentrations d'anticorps mentionnées, varient seulement de 2 à 3 fois (tableau I, fig. 1).

Il apparaît ainsi que la proportionnalité entre la concentration des anticorps et l'intensité de la contraction anaphylactique n'est évidente que lorsque la quantité d'antigène employée est suffisamment élevée. Si elle est insuffisante, la valeur du rapport entre les concentrations d'anticorps et l'intensité des réactions anaphylactiques tend à diminuer au fur et à mesure que l'on approche des doses-seuil d'antigène.

Anticorps par ml	Antigène $\mu\text{g N/ml}$																		
	0,016	31,7	0,04	31,7	0,08	31,7	0,16	31,7	0,4	31,7	0,8	31,7	1,6	31,7	31,7	31,7	6,35	3,17	31,7
2,5 $\mu\text{g N}$	0,0035		0,0044		0,007		0,011		0,015		0,013								0,014
		0,012		0,01		0,007		0,0025											
5 $\mu\text{g N}$	0,003		0,011		0,017		0,019		0,0275		0,033		0,03						0,035
		0,03		0,03		0,021		0,01		0,006		0,003							
10 $\mu\text{g N}$	0,006		0,011		0,021		0,023		0,052		0,055		0,054		0,055				0,056
		0,05		0,042		0,04		0,015		0,016		0,005		0,0035					
20 $\mu\text{g N}$	0,007		0,013		0,025		0,042		0,059		0,07		0,11		0,1		0,13		0,125
		0,13		0,15		0,1		0,085		0,06		0,07		0,023		0,007			

TABLEAU I. — Fragments d'intestins isolés de Cobaye sensibilisés passivement *in vitro* avec des concentrations de 2,5-5-10 et 20 $\mu\text{g N/ml}$ d'anticorps antiovalbumine de Lapin. Contractions anaphylactiques, exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate, $\mu\text{g/ml}$), provoquées par l'addition de diverses quantités d'antigène (ovalbumine) exprimées en $\mu\text{g N/ml}$. Les colonnes qui portent en tête 31,7 $\mu\text{g N/ml}$ illustrent l'importance des réactions anaphylactiques résiduelles.

3. Relation entre la concentration d'anticorps et la quantité d'antigène nécessaire pour déterminer une désensibilisation complète.

Ainsi qu'il est décrit plus haut, si, après l'introduction d'une quantité d'antigène faible, on ajoute, dans le milieu de survie, une seconde dose, une contraction anaphylactique résiduelle se produit chaque fois que la première introduction d'antigène a été insuffisante à saturer la totalité des anticorps et à provoquer la désensibilisation complète de l'organe isolé.

On voit sur le tableau I que pour chaque concentration d'anticorps, les contractions anaphylactiques premières s'accroissent au fur et à mesure que les quantités d'antigène employées augmentent. En même temps, les contractions anaphylactiques résiduelles, déclenchées avec une seconde addition d'une large dose d'antigène (31,7 $\mu\text{g N/ml}$) décroissent jusqu'à disparaître complètement. C'est également à partir de ce moment que les contractions anaphylactiques premières ne se modifient plus, quelle que soit la quantité d'antigène employée.

On peut, par conséquent, en déduire que la concentration d'antigène qui détermine une contraction anaphylactique maximale pour une concentration d'anticorps donnée et fait disparaître la contraction anaphylactique résiduelle, neutralise entièrement les anticorps et désensibilise l'organe isolé.

Dans nos conditions expérimentales, où des concentrations d'anticorps de 2,5 — 5 — 10 et 20 $\mu\text{g N}$ par ml ont été employées pour la sensibilisation des fragments d'iléon *in vitro*, des quantités d'antigène de 0,4 — 1,6 — 3,17 et 6,35 $\mu\text{g N}$ par ml respectivement se sont avérées nécessaires pour désensi-

biliser complètement les organes (tableau I). Ces quantités d'antigène sont constamment 2 à 3 fois supérieures à celles nécessaires pour précipiter les quantités correspondantes d'anticorps au point d'équivalence.

On voit d'après ces résultats qu'une relation directe existe entre la concentration en anticorps utilisée pour sensibiliser un organe isolé et la concentration en antigène nécessaire pour déterminer une contraction anaphylactique maximale et désensibiliser cet organe.

4. Influence de la durée de contact avec l'antigène sur la désensibilisation.

Au cours des expériences précédentes, la deuxième addition de l'antigène était faite 3 minutes après la contraction anaphylactique occasionnée par la première introduction d'une dose faible d'antigène.

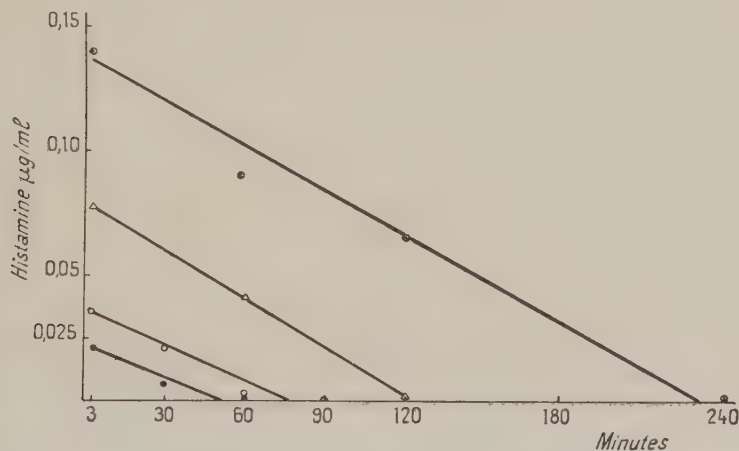


FIG. 2. — Effet désensibilisant d'une concentration liminaire d'antigène (0,016 $\mu\text{g N/ml}$) mise en contact avec des fragments d'iléon de Cobaye sensibilisés passivement *in vitro* avec quatre concentrations différentes d'anticorps : ● 2,5 $\mu\text{g N/ml}$ ○ 5 $\mu\text{g N/ml}$ Δ 10 $\mu\text{g N/ml}$ ⊙ 20 $\mu\text{g N/ml}$.

Ordonnées : concentrations anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate).

Abscisses : durée de contact avec la solution (0,016 $\mu\text{g N/ml}$) d'antigène.

Dans une nouvelle série d'expériences, nous avons introduit dans le milieu de survie une quantité liminaire d'antigène (0,016 $\mu\text{g N/ml}$) et nous l'avons laissée en contact pendant une durée variable avec l'organe sensibilisé. Nous avons exploré ensuite le degré de désensibilisation par l'addition d'une large dose d'antigène (31,7 $\mu\text{g N/ml}$). L'introduction de la seconde dose d'antigène, 3 minutes après la première, détermine une contraction comparable à celle obtenue si on ajoute d'emblée l'antigène en large excès. Cependant, sous l'effet du contact de la première solution d'antigène, les organes sensibilisés se désensibilisent progressivement. Au fur et à mesure que le contact avec la faible concentration d'antigène se prolonge, les contractions anaphylactiques résiduelles diminuent de plus en plus jusqu'à disparition complète. La durée de contact nécessaire pour cette désensibilisation dépend

de la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation : pour des sensibilisations effectuées avec des concentrations de 2,5 — 5 — 10 et 20 $\mu\text{g N}$ d'anticorps, la durée de contact nécessaire avec une solution de 0,016 $\mu\text{g N}$ d'antigène est respectivement de 45, 75, 120 et 240 minutes (fig. 2).

Ainsi le temps nécessaire pour obtenir une désensibilisation complète avec une dose liminaire d'antigène est fonction directe de la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation.

DISCUSSION

Les résultats expérimentaux exposés ci-dessus montrent que l'intensité de la réaction anaphylactique dépend de la quantité d'antigène lorsque celle-ci est inférieure à une certaine dose (dose saturante). Lorsqu'on est en deçà de cette limite la réaction diminue si on diminue la dose d'antigène et il existe une dose seuil d'antigène au-dessous de laquelle on n'observe pas de contraction. D'autre part les contractions anaphylactiques déclenchées avec des doses supra-liminaires, mais faibles d'antigène (0,016, 0,04 et 0,08 $\mu\text{g N/ml}$ d'ovalbumine) sont plus importantes lorsque la sensibilisation a été effectuée avec une plus grande quantité d'anticorps. Cependant la différence entre les réactions anaphylactiques observées chez des organes sensibilisés avec des doses d'anticorps variant de 8 fois (de 2,5 à 20 $\mu\text{g N}$ d'anticorps par ml) est bien plus importante lorsqu'on utilise une dose déclenchante d'antigène forte (elle est alors de 9 fois) que lorsque la dose d'antigène est faible (elle n'est que de 2 à 3 fois) (tableau I).

Rapprochons de ces données l'observation de KABAT et coll. (1947) faite au cours d'une étude de l'anaphylaxie passive générale. Ces auteurs rapportent que, pour obtenir une mortalité de 50 p. 100 des cobayes sensibilisés avec des doses régulièrement mortelles d'anticorps, il faut la même quantité d'antigène (7 à 8 $\mu\text{g N}$ d'ovalbumine) même si les doses d'anticorps diffèrent entre elles de 5 fois (30 $\mu\text{g N}$ à 150 $\mu\text{g N}$). Nous pensons que cette observation s'accorde bien avec les nôtres, étant donné que les techniques *in vivo* sont moins précises que les techniques *in vitro*.

Il apparaît ainsi qu'une quantité liminaire d'antigène ne peut activer qu'un nombre restreint de molécules d'anticorps, si elle agit pendant un temps court (3 minutes). Ce nombre de molécules d'anticorps activés serait proportionnel à la concentration de l'antigène. Le fait que les contractions anaphylactiques déclenchées avec une même concentration d'antigène sont plus importantes lorsque les organes sont sensibilisés avec une plus forte concentration d'anticorps n'est pas contradictoire avec cette hypothèse si on tient compte de la distribution des molécules d'anticorps. En effet il est logique d'admettre que la densité des molécules d'anticorps dans un organe sensibilisé est proportionnelle à la concentration utilisée pour la sensibilisation. Les chances de rencontre entre les molécules d'anticorps et les molécules d'antigène dans l'unité de temps seraient plus élevées lorsque le même nombre de molécules d'antigène se trouve en présence d'une densité supérieure des molécules d'anticorps. Il y aura en conséquence plus de molécules d'anticorps activées et la contraction anaphylactique sera relativement plus intense.

Ces vues se confirment, d'une part, par la relation qui existe entre la concentration d'anticorps utilisée pour sensibiliser un organe et la concentration d'antigène nécessaire pour désensibiliser d'emblée cet organe, dose saturante, et, d'autre part, par la relation qui existe entre la concentration d'anticorps et le temps nécessaire pour la désensibilisation avec une concentration liminaire d'antigène.

Comme il ressort de nos expériences, la quantité nécessaire d'antigène pour désensibiliser d'emblée (en 3 à 4 minutes) un organe sensibilisé est proportionnelle à la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation : un organe sensibilisé dans une solution de $2,5 \mu\text{g N}$ d'anticorps par ml, est entièrement désensibilisé avec une quantité de $0,4 \mu\text{g N}$ d'ovalbumine par ml, tandis qu'un organe sensibilisé avec une concentration de $20 \mu\text{g N}$ d'anticorps par ml nécessite $6,35 \mu\text{g N/ml}$ de cet antigène.

A cet égard nos résultats diffèrent de ceux obtenus par OVARY (1959) avec l'anaphylaxie cutanée passive. D'après cet auteur, la dose d'antigène nécessaire pour produire une réaction maximale serait inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps administrée. Mais la méthode de l'anaphylaxie cutanée passive apporte certaines causes d'erreur qui limitent la portée de ces résultats.

En premier lieu, la réaction maximale peut être obtenue lorsque les possibilités de réaction de l'aire sensibilisée de la peau sont atteintes, sans que les anticorps qui se trouvent dans cette aire soient entièrement saturés. Le contrôle de la réaction anaphylactique résiduelle est en effet irréalisable en anaphylaxie passive cutanée.

D'autre part, comme l'ont montré antérieurement OVARY et BIER (1953), quand on injecte dans la peau de Cobaye une quantité élevée d'anticorps, ceux-ci diffusent de l'endroit de l'injection dans tout le corps de l'animal et il est possible de démontrer la sensibilisation d'endroits de la peau éloignés du point de l'injection des anticorps. Avec l'injection locale de $3,2 \mu\text{g N}$ d'anticorps, cette sensibilisation à distance est tout à fait nette 24 heures après l'injection initiale, et même l'injection de $0,32 \mu\text{g N}$ d'anticorps provoque quelquefois une sensibilisation faible généralisée. Or, au cours des expériences sur la relation quantitative entre anticorps et antigène, OVARY (1959) a injecté deux doses d'anticorps : $0,02 \mu\text{g N}$ et $1,0 \mu\text{g N}$. La seconde est une dose peut-être trop élevée pour l'anaphylaxie passive cutanée parce qu'elle atteint les limites de la réactivité de la peau et aussi parce qu'une partie des anticorps diffusent loin de l'endroit de l'injection et par conséquent leur réaction n'est pas enregistrée.

Si, dans nos expériences, on ne prenait en considération que la zone des doses où la quantité d'antigène ajoutée est insuffisante pour neutraliser tous les anticorps (fig. 1, haut), il serait possible de tirer une conclusion similaire à celle défendue par OVARY. Pour obtenir une contraction anaphylactique identique de deux organes sensibilisés avec différentes concentrations d'anticorps, il faut une quantité moindre d'antigène dans le cas de l'organe sensibilisé avec une forte dose d'anticorps. Mais cette conclusion serait erronée car les doses correspondantes d'antigène ne neutralisent qu'une partie des anticorps présents.

La dernière série de nos expériences montre qu'il est possible de désensi-

biliser entièrement un organe en utilisant une faible concentration d'antigène pourvu que l'on prolonge suffisamment la durée de contact de l'antigène avec l'organe préalablement sensibilisé. Dans ces conditions, la durée de contact est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation : un organe sensibilisé avec une concentration de $2,5 \mu\text{g N}$ d'anticorps par ml nécessite 45 minutes de contact avec une solution de $0,016 \mu\text{g N}$ d'antigène par ml ; un autre, sensibilisé avec une concentration de $20 \mu\text{g N}$ d'anticorps par ml nécessite presque 240 minutes de contact avec la même solution d'antigène pour être entièrement désensibilisé (fig. 2).

Ces variations de la durée de contact sont sans doute dues aux modalités de la diffusion de l'antigène dans le tissu sensibilisé. Puisque la concentration de l'antigène et partant la vitesse de sa diffusion est constante, le temps nécessaire pour la rencontre et la neutralisation de toutes les molécules d'anticorps sera d'autant plus long que celles-ci sont plus nombreuses.

Ces résultats obtenus avec la technique de sensibilisation passive *in vitro* sont en accord avec les résultats rapportés par PRUZANSKY et coll. (1960). Ces auteurs ont en effet montré que, chez des cobayes sensibilisés passivement *in vivo*, avec des quantités d'anticorps suffisantes pour déterminer un choc mortel, l'injection d'une dose faible d'antigène exercera une action protectrice contre l'injection ultérieure d'une dose régulièrement mortelle de cet antigène. Cette action protectrice sera d'autant plus marquée que l'intervalle qui sépare les deux injections sera plus grand ou bien que la première dose d'antigène était plus élevée. Ainsi, concluent-ils, la désensibilisation n'est pas instantanée mais elle se développe à une cadence qui est directement proportionnelle soit à la quantité d'antigène injectée soit au temps écoulé depuis l'injection de l'antigène.

Par conséquent, une large dose d'antigène, ainsi que l'ont observé KABAT et LANDOW (1942), est nécessaire dans le déclenchement du choc anaphylactique, parce qu'elle doit assurer une rapidité adéquate de la diffusion de cet antigène dans l'organisme de l'animal.

L'interprétation quantitative des résultats de nos expériences ne peut être exhaustive à cause de l'impossibilité dans laquelle nous nous trouvons d'évaluer la quantité exacte des molécules d'anticorps qui participent effectivement à la sensibilisation de l'organe isolé. Ainsi aucun rapport chiffré ne peut-il être avancé. Néanmoins, les relations quantitatives entre les concentrations d'anticorps et celles d'antigène que nous rapportons dans cette étude permettent d'aborder avec plus de précision le mécanisme de la réaction anaphylactique et du processus de la désensibilisation.

RÉSUMÉ

La dose seuil d'antigène (ovalbumine), nécessaire pour déclencher une réaction anaphylactique des fragments d'iléon de Cobaye sensibilisés passivement *in vitro* avec diverses concentrations d'anticorps, est le $0,016 \mu\text{g}$ d'azote par ml.

Les concentrations anaphylactiques déclenchées avec des doses faibles

d'antigène sont plutôt en rapport avec les quantités d'antigène, qu'avec les concentrations d'anticorps utilisées pour la sensibilisation.

Une relation directe relie les quantités d'anticorps et d'antigène qui participent à la réaction anaphylactique. Ainsi :

a) la quantité d'antigène, nécessaire pour provoquer une contraction maximale et pour neutraliser tous les anticorps, est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation ;

b) la durée de contact, d'une dilution donnée d'antigène avec un tissu sensibilisé, nécessaire pour produire une désensibilisation complète, est directement proportionnelle à la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation.

SUMMARY

The threshold dose of antigen (ovalbumin) necessary to provoke an anaphylactic reaction in fragments of guinea-pig ileum sensitized passively *in vitro* with diverse concentrations of antibodies, is 0,016 μ g of Nitrogen per milliliter.

With small quantities of antigen, the intensity of the anaphylactic contraction is more related to the dose of antigen than to the concentration of antibody utilized for the sensitization.

There is a direct relationship between the quantity of antibodies and the quantity of antigen that participate in the anaphylactic reaction. Thus :

a) the quantity of antigen necessary to provoke a maximal contraction and to neutralize all the antibodies, is directly proportional to the concentration of antibodies utilized for the sensitization ;

b) the length of contact of a given dilution of antigen with a sensitized tissue that is necessary to produce a complete desensitization is directly proportional to the concentration of antibodies utilized for the sensitization.

BIBLIOGRAPHIE

- BENACERRAF, B. et KABAT, E. A. (1949). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. V. — The latent period in passive anaphylaxis in its relation to the dose of rabbit antiovalbumin. *J. Immunol.*, **62**, 517.
- KABAT, E. A., COFFIN, G. S. et SMITH, D. J. (1947). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. III. *J. Immunol.*, **56**, 377.
- KABAT, E. A. et LANDOW, W. (1942). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. *J. Immunol.*, **44**, 69.
- LIACOPOULOS, P. (1961). L'anaphylaxie passive *in vitro*. I. — La méthode de sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **53**, 825-835.
- MONGAR, J. L. et SCHILD, H. O. (1952). A comparison of the effects of anaphylactic shock and of chemical histamine releasers. *J. Physiol., London*, **118**, 461.
- OVAR, Z. (1959). Passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig : degree of reaction as a function of the quantity of antigen and antibody. *Int. Arch. Allergy*, **14**, 18.
- OVAR, Z. et BIER, O. G. (1953). Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig and its relationship to the Arthus phenomenon. *J. Immunol.*, **71**, 6.
- PRUZANSKY, J. J., FEINBERG, S. M. et HARRIS, M. (1960). Some kinetics aspects of the combination of antigen and antibody *in vivo*. *J. Immunol.*, **84**, 292.
-

L'anaphylaxie passive *in vitro*

III. — Modalités de la sensibilisation *in vitro* *

PAR

P. LIACOPOULOS

[*Centre de Recherches Allergiques et Immunologiques* (1) (C.N.R.S., Institut National d'Hygiène et Association Claude-Bernard), Directeur : Pr B. N. Halpern.]

On peut distinguer dans l'anaphylaxie active deux stades : le premier comprend la pénétration de l'antigène et la production des anticorps spécifiques ; le second, la mise en circulation des anticorps et la sensibilisation des tissus. L'anaphylaxie n'apparaît que lorsque les tissus de l'animal ont été sensibilisés par les anticorps circulants. Mais en anaphylaxie active, la sensibilisation tissulaire se produit d'une manière insidieuse, au fur et à mesure que les anticorps se déversent dans la circulation.

La découverte de l'anaphylaxie passive par NICOLLE (1907) et par OTTO (1907) a permis de dégager peu à peu cette notion de la sensibilisation tissulaire. Ainsi WEIL (1913) a montré que lorsqu'on injecte dans la veine d'un animal une quantité donnée d'anticorps, la sensibilisation, c'est-à-dire la possibilité de déclencher des manifestations morbides à la suite de l'injection de l'antigène, n'apparaît que quelques heures après l'injection des anticorps. Pourtant à ce moment leur taux dans le sang est bien inférieur à celui qu'on observe immédiatement après l'injection. De plus, cet auteur a montré que les anticorps circulants exercent une action protectrice : l'injection d'une petite dose habituellement mortelle d'antigène chez un animal qui a reçu une dose élevée d'anticorps, ne produit aucun symptôme ; cependant, cet animal est fortement sensibilisé comme en témoigne une seconde injection d'une quantité suffisante d'antigène. SCHULTZ (1910), DALE (1913) ont montré que, lorsqu'on introduit l'antigène dans le milieu de survie d'un organe prélevé chez un animal sensibilisé, on observe une violente contraction. Ces organes deviennent ensuite insensibles à cet antigène, mais si on les plonge dans un immun-sérum pour quelques heures, ils se sensibilisent

* Reçu le 3 mars 1962.

(1) Hôpital Broussais, 96, rue Didot, Paris (14^e).

de nouveau et une nouvelle introduction de l'antigène provoque une nouvelle contraction anaphylactique (DALE, 1913). En continuant ses expériences DALE a perfusé pendant une heure avec du liquide de Tyrode un utérus sensibilisé. Après la perfusion, l'utérus répond à l'antigène par une contraction violente, identique à celle de l'utérus non perfusé.

Ces travaux conduisent à penser que la sensibilisation correspond à un mécanisme de « fixation » des anticorps sur les cellules, ou de pénétration dans les cellules, et sont à la base de la théorie cellulaire de l'anaphylaxie.

Plus récemment, KABAT et ses collaborateurs (1942, 1947, 1949) ont établi les modalités de la sensibilisation au cours de l'anaphylaxie passive *in vivo* en montrant, d'une part, que l'intensité de la sensibilisation est proportionnelle à la quantité d'anticorps injectée, et d'autre part, que les phénomènes d'anaphylaxie apparaissent d'autant plus rapidement que la quantité d'anticorps injectée est plus grande. Par ailleurs, ils ont confirmé le fait observé par WEIL (1913) qu'un excès d'anticorps dans la circulation nécessite une plus grande quantité d'antigène pour déterminer la mort de l'animal.

En utilisant la technique de l'anaphylaxie passive cutanée OVARY et BIER (1953 *a*) ont démontré que l'importance de la réaction anaphylactique cutanée est proportionnelle à la quantité d'anticorps injectée et que la sensibilisation cutanée locale apparaît plus précocement et dure plus longtemps lorsque la quantité d'anticorps injectée est plus élevée.

Il apparaît ainsi que la sensibilisation tissulaire relève d'un mécanisme particulier, distinct de celui de la production et de la mise en circulation des anticorps. La méthode de l'anaphylaxie passive *in vitro* présente sur les méthodes précédentes certains avantages qui la rendent particulièrement apte à l'étude de ce processus. Nous allons étudier ici quelles sont les modalités de la sensibilisation tissulaire *in vitro* et discuter les renseignements que nous pouvons en tirer sur le mécanisme intime de ce phénomène.

TECHNIQUES

La technique de la sensibilisation passive *in vitro* a été décrite précédemment (LIACOPOULOS, 1961). Certaines variantes ont été adoptées pour l'étude de l'influence de divers facteurs sur le processus de la sensibilisation tissulaire : *a*) pour étudier l'influence de la température, la sensibilisation des fragments d'intestin isolé a été effectuée dans des milieux dont la température a été fixée à 38°C, 30°C, 20°C et 10°C ; *b*) pour étudier l'influence de la force ionique du milieu sur le processus de sensibilisation, le liquide de Tyrode a été remplacé par un liquide dont la force ionique était de 0,0005 M, son isotonie assurée par du glucose (50 p. 100) et la stabilité du pH, à la valeur de 7, par du bicarbonate de sodium (0,042 p. 1000) ; *c*) l'influence de l'urée a été étudiée en effectuant la sensibilisation dans du liquide de Tyrode additionné d'urée à la concentration de 5 p. 100 (0,8 M).

Quelles que soient les modifications apportées au milieu de sensibilisation, la réaction anaphylactique des fragments d'iléon, sensibilisés *in vitro*, a toujours été déclenchée après que l'on eut replacé l'organe dans une solution normale de Tyrode oxygénée, à la température de 38°C, et que sa réactivité à l'histamine soit revenue à la normale.

RÉSULTATS

1. — Relation entre la concentration en anticorps du milieu de sensibilisation et l'intensité de la réaction anaphylactique.

Pour étudier cette relation, plusieurs fragments du même iléon de Cobaye ont été placés dans des solutions de Tyrode contenant des concentrations croissantes d'anticorps allant de 0,5 à 8 $\mu\text{g N}$ par ml. La durée de sensibilisation était uniformément fixée à une heure et la température maintenue à 38°C. L'intensité de la réaction anaphylactique a été évaluée comme dans toutes nos expériences

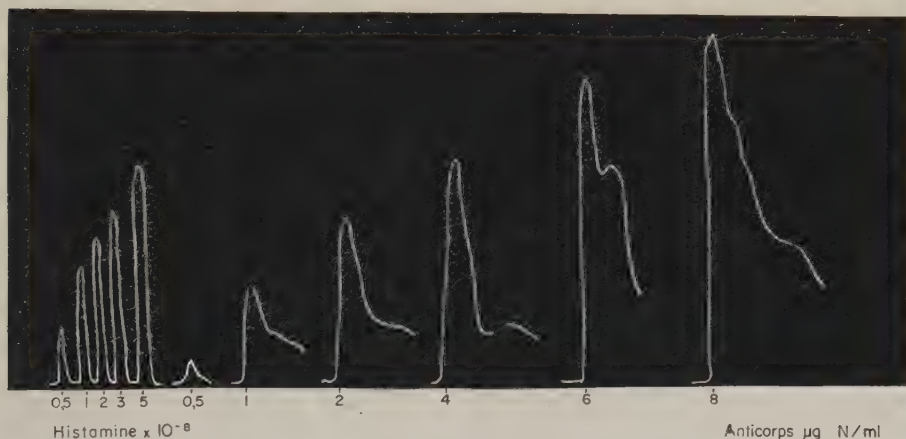


FIG. 1. — Influence de la concentration des anticorps sur l'intensité de la contraction anaphylactique de fragments d'intestin de Cobaye sensibilisés *in vitro*. A gauche : étalonnage de l'intestin à l'histamine (bichlorhydrate). Concentration d'anticorps dans le milieu de sensibilisation en $\mu\text{g N/ml}$. Durée d'incubation, 60 minutes.

par la hauteur de la contraction anaphylactique provoquée par l'introduction de l'antigène dans le milieu de survie. Les résultats représentés sur la fig. 1, indiquent que l'intensité de la contraction anaphylactique, dans les limites des concentrations d'anticorps employées, est proportionnelle à la teneur du milieu de sensibilisation en anticorps.

Ces résultats confirment les travaux de KABAT et LANDOW (1942) et d'OVARY et BIER (1953) sur la proportionnalité qui existe entre la dose d'anticorps injectée et l'intensité des manifestations anaphylactiques après l'injection de l'antigène, au cours de l'anaphylaxie passive *in vivo*.

2. — Relation entre la concentration en anticorps et la durée d'incubation dans le milieu de sensibilisation.

La relation entre la durée de la sensibilisation et l'importance de la contraction anaphylactique est illustrée sur la fig. 2. Des fragments du même intestin ont été

placés dans des cuves contenant la même concentration d'anticorps ($2 \mu\text{g N/ml}$) et y ont séjourné pendant des temps variant de 30 minutes à 2 heures. L'importance de la contraction anaphylactique après l'addition de l'antigène s'accroît régulièrement avec l'augmentation de la durée d'incubation. Mais les renseignements quantitatifs obtenus par ce procédé sont limités, car la contraction anaphylactique devient rapidement maximale.

Pour obvier à cette difficulté, nous avons fait varier à la fois le temps de sensibilisation et la concentration en anticorps du milieu de survie, de façon à obtenir

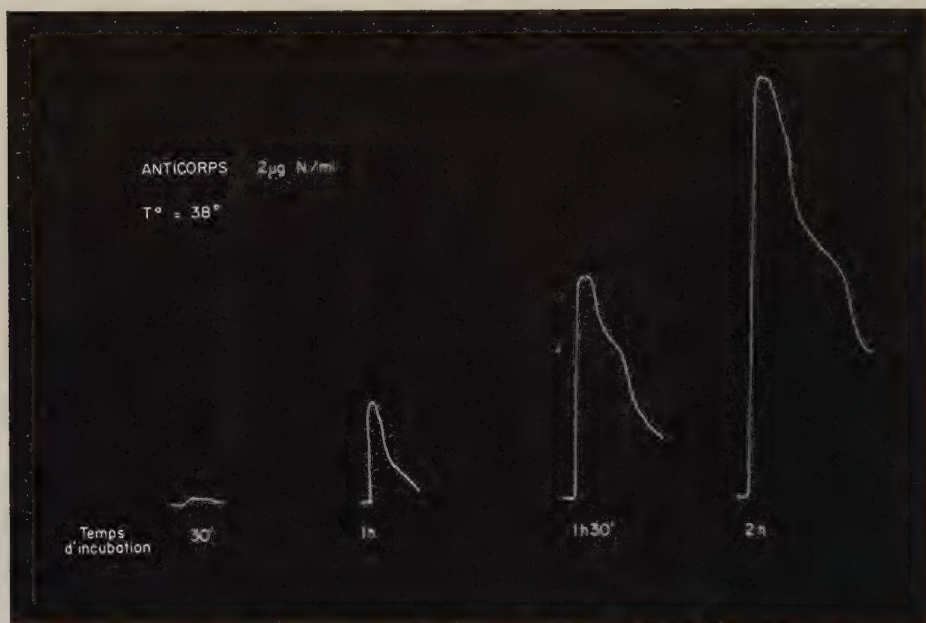


FIG. 2. — Influence de la durée d'incubation sur l'intensité de la contraction anaphylactique de fragments d'intestin de Cobaye sensibilisés *in vitro* avec la même concentration d'anticorps, pendant des périodes de temps croissantes.

toujours une contraction sub-maximale, de la même intensité. A cet effet nous avons choisi comme référence, la contraction produite par un intestin sensibilisé pendant une heure dans une solution contenant $1 \mu\text{g N/ml}$ d'anticorps. En faisant varier ensuite le temps d'incubation de 4 minutes à 8 heures, nous avons établi la concentration en anticorps nécessaire pour produire une contraction anaphylactique identique à la contraction de référence.

Les résultats de ces expériences sont indiqués dans le tableau I.

Il apparaît, d'après ce tableau, que si on augmente la durée d'incubation dans le milieu de sensibilisation on doit abaisser la concentration en anticorps pour obtenir une réaction anaphylactique de la même intensité. Mais la diminution de la concentration en anticorps est plus importante que l'augmentation du temps d'incubation. Lorsque ce temps augmente de 2 fois, il faut 4 fois moins d'anti-

corps pour obtenir la même contraction. Ainsi dans nos expériences nous avons pu, en augmentant le temps d'incubation de 3 minutes $\frac{3}{4}$ à 480 minutes, diminuer la concentration en anticorps de 256 $\mu\text{g N}$ à 0,016 $\mu\text{g N/ml}$.

TABLEAU I. — Relation entre le temps d'incubation et la concentration nécessaire pour produire la même contraction anaphylactique.

Temps mn s		Anticorps conc. en $\mu\text{g N/ml}$
3	45	256
7	30	74
15		16
30		4
60		1
120		0,25
240		0,062
360		0,031
480		0,016

L'analyse graphique de ces résultats indique que pour obtenir une réponse anaphylactique donnée la concentration nécessaire en anticorps serait inversement proportionnelle au carré du temps d'incubation (fig. 3 A et B). Cette relation peut être exprimée par la formule :

$$C = f \frac{1}{t^2}$$

Il est intéressant de rapprocher ces résultats de ceux observés au cours de l'anaphylaxie passive *in vivo*. BENACERRAF et KABAT (1949) montrèrent que pour obtenir un choc anaphylactique mortel chez des cobayes sensibilisés passivement, le temps de latence nécessaire varie en sens inverse de la quantité d'anticorps injectée. Il en est de même en anaphylaxie passive cutanée (OVARY et BIER, 1953).

Ainsi, la concentration en anticorps et le temps d'incubation, qui correspond au temps de latence de l'anaphylaxie passive *in vivo*, reliés par une fonction inverse constituent les deux facteurs déterminants de l'anaphylaxie passive *in vivo* ou *in vitro*. De leur importance respective dépend l'intensité de la sensibilisation d'un animal ou d'un organe isolé.

3. — Influence de la température.

L'influence de la température sur le processus de la sensibilisation passive *in vitro* a été étudiée de deux manières : soit en mesurant le temps nécessaire pour obtenir, avec la même concentration d'anticorps, la même contraction anaphylactique, après une sensibilisation à des températures différentes (A), soit en déterminant la concentration d'anticorps nécessaire pour obtenir la même contraction

anaphylactique après une sensibilisation pendant la même durée d'incubation à des températures variables (B).

Dans ces essais, l'intestin, à la fin de la sensibilisation, a été remplacé dans une solution normale de Tyrode, oxygénée, à 38°C. La réaction anaphylactique n'a été déclenchée que lorsque l'organe a récupéré sa sensibilité normale à l'histamine.

Ces essais ont été réalisés aux températures de 38°C, 30°C, 20°C et 10°C. Les résultats sont résumés dans le tableau II.

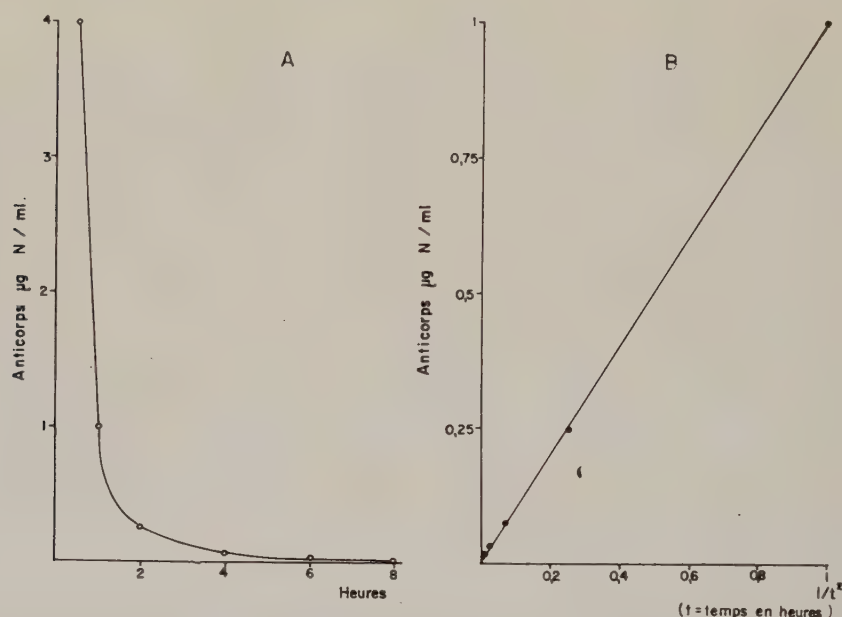


FIG. 3. — Relation entre la concentration d'anticorps et le temps d'incubation nécessaires pour obtenir la même contraction anaphylactique de fragments d'intestins sensibilisés *in vitro*. La contraction anaphylactique de référence est celle produite par une sensibilisation avec 1 $\mu\text{g N}$ d'anticorps/ml pendant 1 heure. En A, ordonnées : concentrations d'anticorps, abscisses : temps d'incubation. En B, ordonnées : concentration d'anticorps, abscisses : inverse du carré du temps (en heures).

TABLEAU II. — Influence de la température sur le processus de sensibilisation *in vitro*.

Température	A Temps en mn	B Anticorps, conc. en $\mu\text{g N/ml}$
38°	60	1
30°	165	4
20°	260	9
10°	420	18

A : Temps d'incubation nécessaire à différentes températures pour obtenir une contraction de la même hauteur après sensibilisation avec la même concentration d'anticorps (1 $\mu\text{g N/ml}$).

B : Concentration d'anticorps nécessaire pour obtenir des contractions égales après une sensibilisation à différentes températures (temps d'incubation constant : 60 mn).

D'après ces résultats il est évident que le processus de sensibilisation *in vitro* est considérablement ralenti au fur et à mesure que la température du milieu s'abaisse. Toutefois il est possible de remédier à ce ralentissement soit en allongeant la durée d'incubation, soit en augmentant la concentration d'anticorps dans le milieu de sensibilisation.

De plus, les chiffres rapportés dans le tableau II permettent de calculer le coefficient thermique (Q_{10}) du processus de sensibilisation ; les valeurs de Q_{10} trouvées sont de 3,2 pour les températures entre 38°C et 30°C et de 1,6 entre 30°C et 20°C et entre 20°C et 10°C.

Une sensibilisation peut même être obtenue à des températures aussi basses que 5°C comme l'avait déjà signalé HARTLEY (1939) ; mais à cette température, le processus de sensibilisation est très ralenti.

4. — Influence de la concentration des électrolytes dans le milieu de sensibilisation.

Les anticorps comme toutes les gamma-globulines sont des ampholytes et portent sur la surface de leurs molécules des charges électriques, positives et négatives. Il en est de même pour les cellules dont la membrane est polarisée grâce à l'équilibre des charges électriques, positives et négatives, des protéines qui la constituent. Ainsi, la composition du milieu, et en particulier sa concentration en électrolytes, doit exercer une influence sur le comportement des uns et des autres au cours de la sensibilisation.

Nous avons été ainsi amenés à étudier le rôle de la concentration des électrolytes sur la cinétique de la sensibilisation. Toutes les expériences précédemment rapportées ont été effectuées dans du liquide de Tyrode dont la concentration électrolytique est proche de celle du sérum sanguin : 0,15 M. Dans cette étude, la concentration saline a été abaissée jusqu'à 0,0005 M. L'isotonie du milieu était assurée par du glucose (50 p. 1000) et la stabilité du pH à la valeur de 7 environ par du bicarbonate de sodium (0,042 p. 1000).

Les anticorps utilisés dans ces essais provenaient d'un immunosérum anti-ovalbumine de Lapin préalablement dialysé pendant 24 heures dans la solution tamponnée de glucose, pour être débarrassé de ses électrolytes.

Les fragments d'intestin, avant d'être immergés dans ce milieu de sensibilisation étaient soigneusement lavés avec la même solution de glucose. Pendant la période d'incubation qui en général était courte, n'excédant pas les 30 minutes, la concentration saline du milieu s'accroissait, probablement à cause de la libération d'ions par l'intestin isolé, mais sans jamais dépasser 0,002 M (exprimés en NaCl.)

Comme toujours, au cours de cette étude nous avons effectué parallèlement des expériences dans des conditions standard (solution de Tyrode) qui devaient servir de témoins. Après la fin de la sensibilisation, l'étalonnage des intestins à l'histamine, l'introduction de l'antigène et la réaction anaphylactique, s'effectuaient dans une solution de Tyrode.

a) CINÉTIQUE DE LA SENSIBILISATION EN MILIEU NON ÉLECTROLYTIQUE.

Lorsqu'on sensibilise des fragments d'intestin avec la même concentration d'anticorps et pendant le même temps mais dans deux milieux différents quant à leur concentration électrolytique, l'un étant le milieu de Tyrode normal, et l'autre un milieu dépourvu des sels, on constate que la contraction anaphylactique du fragment sensibilisé dans le milieu non électrolytique est considérablement plus importante que celle qui est produite par le fragment sensibilisé dans une solution à la concentration saline habituelle (0,15 M) (fig. 4).

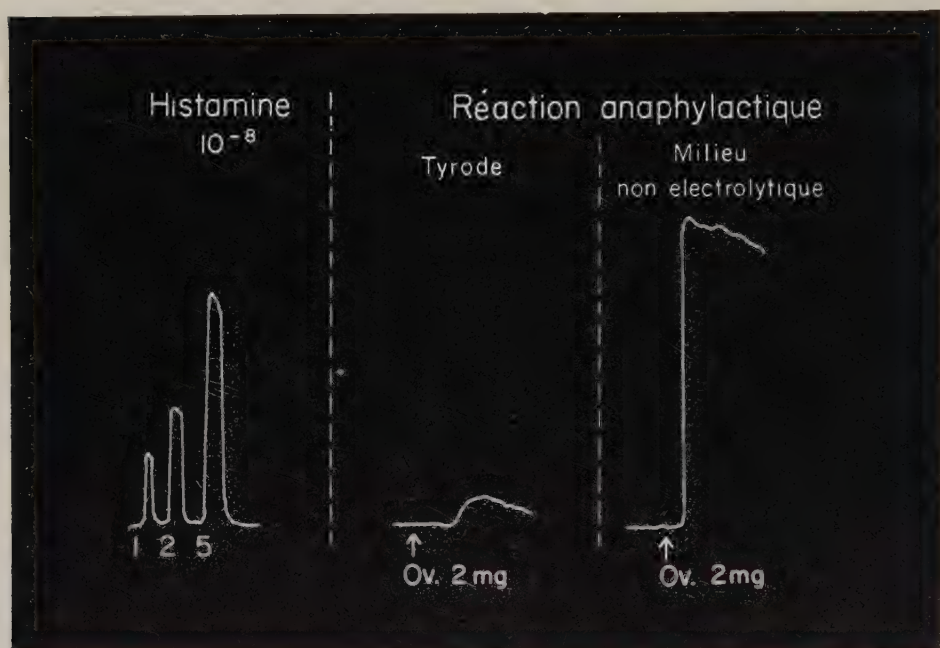


FIG. 4. — Contraction anaphylactique de deux fragments d'intestin de Cobaye sensibilisés *in vitro* avec 2 μ g N/ml d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin, pendant 20 minutes dans une solution de Tyrode et dans une solution isotonique de glucose (milieu non électrolytique). A gauche: étalonnage de l'intestin avec de l'histamine (bichlorhydrate).

Le processus de sensibilisation dans le milieu à faible concentration saline est donc significativement accéléré. Ceci apparaît mieux lorsque la sensibilisation dans les deux milieux est faite avec la même concentration en anticorps mais en variant la durée d'incubation de manière à obtenir des contractions anaphylactiques identiques. Sur la fig. 5 est rapportée cette série d'expériences. On voit que la vitesse de la sensibilisation est nettement plus augmentée dans le milieu non électrolytique.

Cet effet n'est pas dû à la présence de glucose dans la solution non électrolytique. Nous avons préparé des solutions dont le support osmotique était assuré

par du fructose, lactose, saccharose, ou des acides aminés tels que la glycocolle, l'alanine, l'acide gamma-aminobutyrique, dans tous les cas, les résultats étaient les mêmes.

Nous pouvons ainsi déduire de ces expériences que l'absence des électrolytes accélère fortement le processus de sensibilisation.

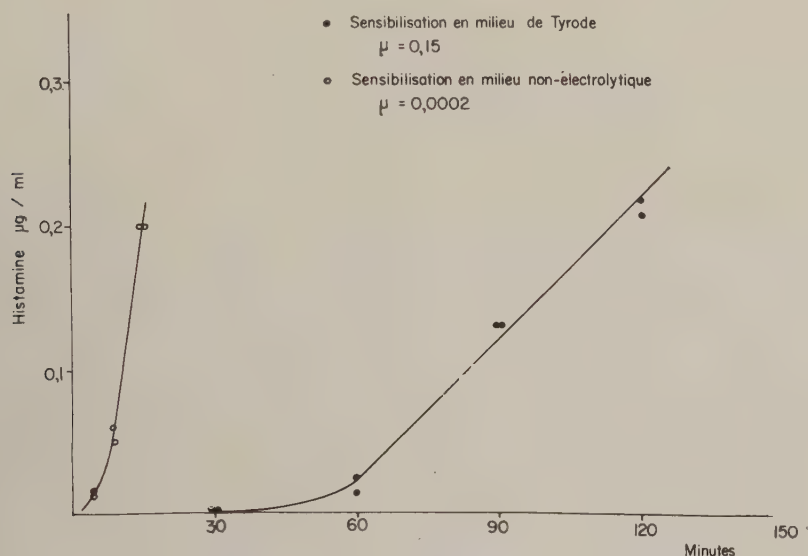


FIG. 5. — Contractions anaphylactiques de fragments d'intestin du même Cobaye, sensibilisés *in vitro* pendant des durées variables, avec 2 µg N/ml d'anticorps de Lapin anti-ovalbumine : dans la solution de Tyrode (●) et dans une solution non électrolytique (○). Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

b) INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DES ÉLECTROLYTES DU MILIEU SUR LA VITESSE DE SENSIBILISATION.

Si c'est l'absence des électrolytes qui conditionne l'accélération du processus de sensibilisation, une augmentation de leur concentration dans le milieu de sensibilisation devrait réduire et finalement annuler cet effet.

Pour confirmer cette hypothèse, nous avons sensibilisé plusieurs fragments du même iléon de Cobaye dans des solutions tamponnées de glucose contenant la même concentration d'anticorps, mais des concentrations croissantes de chlorure de sodium. Les concentrations respectives de glucose et de NaCl ont été calculées de manière que l'isotonie des solutions soit toujours respectée. Les contractions anaphylactiques obtenues à la suite des incubations de durée variable dans ces solutions sont représentées dans la fig. 6.

Il ressort de ces résultats que lorsque la concentration du NaCl dans le milieu de sensibilisation s'accroît, la vitesse de la sensibilisation diminue, se rapprochant de plus en plus de celle qui est observée en solution de Tyrode.

Une action similaire sur la vitesse de sensibilisation a été observée avec d'autres électrolytes, notamment KCl, KBr, MgSO_4 , CaCl_2 . Nous avons comparé l'action respective de ces électrolytes en déterminant le temps d'incubation nécessaire pour obtenir le même degré de sensibilisation dans les milieux contenant ces sels à diverses concentrations. Les résultats sont indiqués dans le tableau III.

L'ensemble de ces résultats indique que la vitesse de sensibilisation est directement reliée à la force ionique du milieu (et non à la concentration, lorsqu'il s'agit d'ions multivalents) indépendamment de la nature chimique des ions.

Il est important de signaler que l'immersion des organes dans le milieu à faible

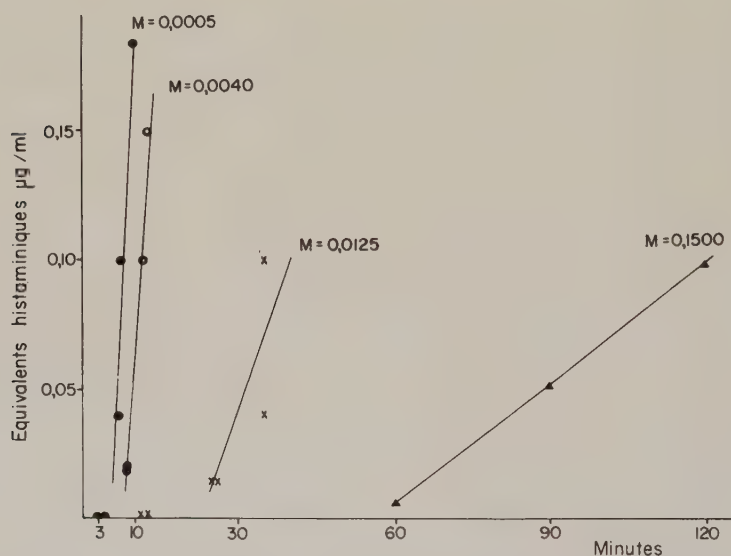


FIG. 6. — Influence de la concentration de NaCl sur la cinétique de la sensibilisation des fragments du même intestin, sensibilisés avec 2 μg N/ml d'anticorps de Lapin anti-ovalbumine, dans une solution tamponnée de glucose contenant différentes concentrations de NaCl. Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

force ionique avant ou après la sensibilisation ne modifie pas la réaction anaphylactique. La libération d'histamine provoquée par l'anaphylatoxine n'est pas, non plus, influencée par un tel traitement. Nous pouvons ainsi conclure que l'augmentation de la contraction anaphylactique, quand la sensibilisation a lieu dans un milieu à faible force ionique, est due à une accélération de la vitesse de la sensibilisation et non à une modification du processus de libération de l'histamine.

Ainsi, les charges électriques des molécules protéiniques semblent jouer un rôle important dans le processus de sensibilisation. Nous allons voir que l'influence de la concentration en ions hydrogène du milieu sur la sensibilisation, qui fait l'objet du chapitre suivant, est aussi en faveur de cette hypothèse.

TABLEAU III. — Vitesse de sensibilisation dans des milieux à force ionique variée.

Expériences N°	Concentration moléculaire ($\times 10^{-3}$) des électrolytes dans la solution tamponnée de glucose contenant 1 μg N/antic. /ml	Force ionique ($\times 10^{-3}$)	Temps* (en mn)
1	nulle	0,5	11
	5,0 M NaCl	5	23
	1,5 M MgSO_4	6	27
	9,0 M NaCl	9	36
	2,7 M MgSO_4	11	38
2	nulle	0,5	11
	2,7 M MgSO_4	11	29
	14,0 M NaCl	14	42
	5,0 M MgSO_4	20	45
3	nulle	0,5	12
	7 M KC_1	7	37
	7 M KB_2	7	30
	9 M NaCl	9	40
	10 M KC_1	10	55
4	nulle	0,5	6
	40 N NaCl	4	9
	1,9 M CaCl_2	5	18
	3,5 M CaCl_2	11	23
	12,5 M NaCl	13	29
	12,5 M KB_2	13	24
5	nulle	0,5	5
	9 M KBr	9	14
	9 M KCl	9	15
6	nulle	0,5	10
	5 M NaCl	5	20
	5 M KCl	5	20
	8 M KCl	8	24
	9 M NaCl	9	28

* Temps d'incubation nécessaire pour obtenir une contraction anaphylactique équivalente à la contraction produite par 0,05 μg /ml d'histamine (bichlorhydrate).

5. — Influence de la concentration en ions d'hydrogène du milieu de sensibilisation.

L'importance des charges électriques dans le processus de sensibilisation nous a amené à étudier l'influence du pH sur ce phénomène.

A cet effet la solution de Tyrode qui constitue le milieu normal de sensibilisa-

tion a été modifiée de manière à permettre l'abaissement du pH . Nous avons ainsi substitué au bicarbonate de sodium, d'autres tampons tels que : acide maléique/maléate de sodium, phosphate monopotassique/phosphate dipotassique, acide acétique/acétate de sodium, chlorure d'ammonium/ammoniaque. A l'aide de ces tampons nous avons effectué des sensibilisations dans des milieux d'une part à pH 8,2 (pH de la solution normale de Tyrode) et, d'autre part, à pH 5,8. Les organes isolés ne survivent pas dans un milieu dont le pH est au delà de ces limites.

Le processus de sensibilisation n'est nullement modifié par ces changements

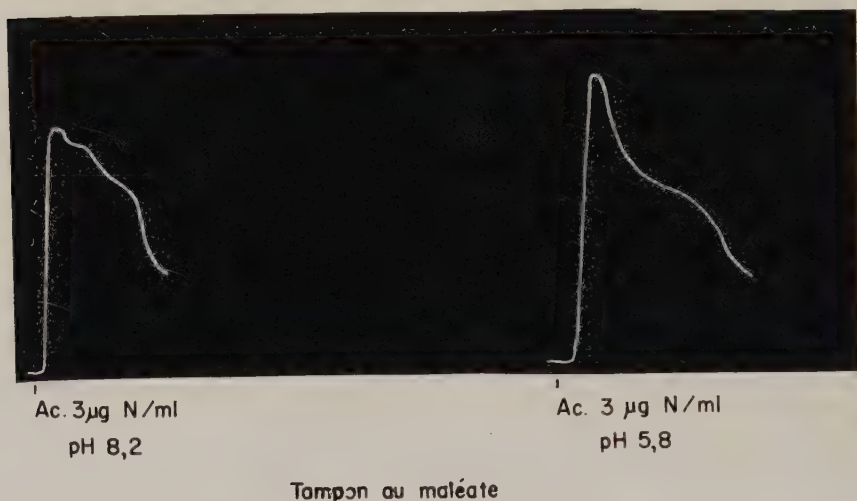


FIG. 7. — Influence du pH de la solution de Tyrode tamponnée avec de l'acide maléique/maléate de sodium sur la sensibilisation.

de pH . L'importance de la sensibilisation effectuée dans un milieu de Tyrode substitué, est sensiblement la même à pH 5,8 ou à pH 8,2. Sur la fig. 7 nous rapportons un exemple de sensibilisation en milieu tamponné au maléate.

Mais dans un milieu non électrolytique (glucose 50 p. 1000) les modifications du pH exercent une influence notable sur le processus de sensibilisation. De plus, dans ce milieu, l'intestin isolé supporte des variations plus importantes de pH , ce qui nous a permis d'explorer l'effet d'une gamme de pH allant de 4,5 jusqu'à 8,5. Les modifications du pH ont été assurées ici par l'addition dans la solution de glucose pure de petites quantités d'acide acétique ou d'ammoniaque qui, ajoutées en quantités minimes, ne changent pratiquement pas la force ionique du milieu.

Dans ces conditions, la cinétique de la sensibilisation est plus rapide à un pH voisin de 7 et elle se ralentit lorsqu'on s'éloigne de ce point, aussi bien vers des pH plus acides que vers des pH plus alcalins. Si on établit la durée d'incubation nécessaire pour obtenir une sensibilisation identique aux diverses valeurs de pH on obtient la relation qui est représentée sur la fig. 8.

Ces modifications de la cinétique de la sensibilisation en fonction de la concentration des ions d'hydrogène en milieu non électrolytique, apporte un argument supplémentaire en faveur de l'intervention de charges électriques dans le processus de sensibilisation. Si cet effet du pH n'est pas perceptible dans un milieu à concentration saline normale, c'est sans doute parce qu'il est masqué par l'effet des électrolytes dont il a été question au chapitre précédent.

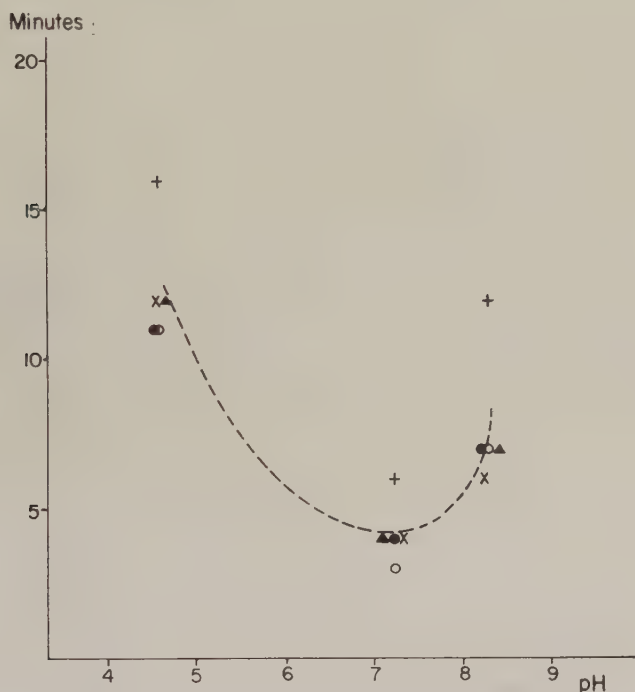


FIG. 8. — Influence de la concentration d'ions d'hydrogène sur la cinétique de la sensibilisation *in vitro* de fragments d'intestin de Cobaye avec 2 μg N/ml d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin dans une solution tamponnée de glucose de force ionique 0,0005. Ordonnées : temps d'incubation nécessaire pour obtenir une contraction anaphylactique équivalente à 0,05 μg /ml d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : pH de la solution tamponnée de glucose.

6. — Action de l'urée sur la sensibilisation *in vitro*.

Un autre facteur qui peut agir sur le processus de la sensibilisation est l'urée. Sa présence dans le milieu de sensibilisation exerce un effet favorisant sur ce processus.

Cet effet qui est déjà évident lorsque la concentration de l'urée atteint 0,16 mol devient très important à la concentration de 0,8 mol. Sur la fig. 9 nous avons un exemple typique de cette action de l'urée. Les deux fragments d'intestin sont sensibilisés avec la même concentration d'anticorps (5 μg N/ml) pendant le même temps (20 mn). Le fragment qui a été sensibilisé en présence de l'urée (0,8 mol) produit une contraction anaphylactique 4 à 5 fois plus importante que le fragment témoin.

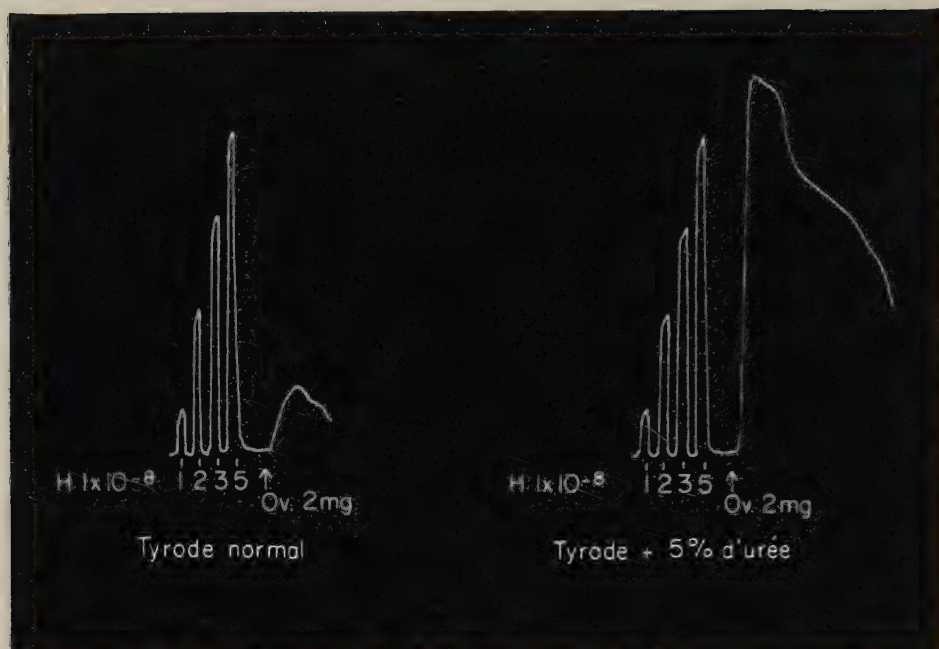


FIG. 9. — Contractions anaphylactiques de deux fragments d'intestin de Cobaye sensibilisés *in vitro* avec $5 \mu\text{gN/ml}$ d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin pendant 20 minutes, en solution normale de Tyrode, et en solution de Tyrode additionnée de 5 p. 100 d'urée (0,8M). H : addition d'histamine (bichlorhydrate) ; Ov. : addition d'ovalbumine.

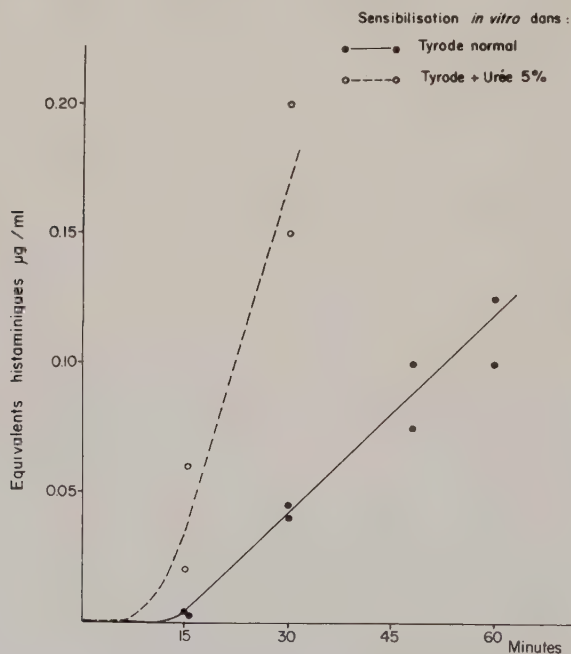
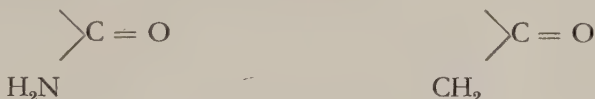


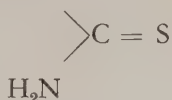
FIG. 10. — Contractions anaphylactiques de fragments d'intestin du même Cobaye sensibilisés *in vitro* pendant des durées variables avec la même concentration d'anticorps ($16 \mu\text{g N/ml}$), dans une solution normale de Tyrode (●), et dans une solution de Tyrode additionnée de 5 p. 100 (0,8 M) d'urée (○). Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

En vue de mieux établir l'importance de l'effet favorisant de l'urée sur la sensibilisation, nous avons sensibilisé avec la même quantité d'anticorps et des périodes d'incubation croissantes, deux séries de fragments d'intestin, d'une part dans du Tyrode normal, et d'autre part dans du Tyrode additionné d'urée (5 p. 100 soit 0,8 M). Après étalonnage à l'histamine, en milieu Tyrode normal, puis addition de l'antigène, nous avons observé que les contractions produites par les organes sensibilisés en présence de l'urée étaient 4 à 5 fois supérieures aux contractions produites par les organes sensibilisés, pendant le même temps dans des conditions standard (fig. 10).

Cet effet favorisant de l'urée sur le processus de la sensibilisation n'apparaît que lorsqu'elle est présente en même temps que les anticorps dans le milieu de sensibilisation. Un traitement des tissus avec l'urée antérieurement ou postérieurement à la sensibilisation ne produit pas le même résultat. En outre l'action de l'anaphylatoxine ou de l'histamine n'est pas modifiée par un traitement avec de l'urée. On peut ainsi en déduire que l'urée influence le processus de sensibilisation même et non le mécanisme de la libération d'histamine ou la sensibilité du muscle lisse à l'histamine. Une action analogue peut être obtenue également avec des corps chimiquement voisins de l'urée H_2N tels que l'acétamide : H_2N



et la thiourée : H_2N



Ces faits seront discutés dans le mémoire suivant.

RÉSUMÉ

A l'aide de la technique de la sensibilisation passive *in vitro* de fragments d'intestin de Cobaye, nous avons pu étudier les modalités du processus de sensibilisation.

Les deux facteurs essentiels, qui déterminent l'intensité de la sensibilisation *in vitro*, sont la concentration des anticorps dans le milieu de survie et la durée d'incubation des organes isolés dans ce milieu. Ces deux facteurs sont reliés par une fonction qui peut être exprimée par la formule $C = f\left(\frac{1}{t^2}\right)$.

Plusieurs facteurs se sont montrés capables d'influencer le processus de sensibilisation en modifiant sa vitesse : la température, la force ionique, le pH du milieu non électrolytique et l'urée.

SUMMARY

Anaphylaxis passively induced *in vitro*.III. — Conditions for *in vitro* sensitization.

Using the technique *in vitro* sensitization of strips of guinea pig ileum, we were able to study this process.

The two main factors which determine the intensity of *in vitro* sensitization are the antibody concentration, and the length of incubation of the isolated organs, in the sensitizing medium. The relation between these two factors may be expressed by the formula $C = f\left(\frac{1}{t^2}\right)$.

Other factors influencing the rate of sensitization are temperature, ionic strength, pH of the non-electrolytic medium and urea concentration.

BIBLIOGRAPHIE

- BENACERRAF, B. et KABAT, E. A. (1949). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. V. The latent period in passive anaphylaxis in its relation to the dose of rabbit antiovalbumine. *J. Immunol.*, **62**, 517-522.
- DALE, H. H. (1913). The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. *J. Pharmacol.*, **4**, 167-223.
- HARTLEY, P. (1939). Passive sensitization *in vitro*. *Cong. int. Microbiol.*, **3**, 343.
- KABAT, E. A., COFFIN, G.S. et SMITH, D. J. (1947). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. III. *J. Immunol.*, **56**, 377-384.
- KABAT, E. A. et LANDOW, W. (1942). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. *J. Immunol.*, **44**, 69-74.
- LIACOPOULOS, P. (1961). L'anaphylaxie passive *in vitro*. I. La méthode de sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol. Paris*, **53**, 825-835.
- NICOLLE, M. (1907). Contribution à l'étude du « phénomène d'Arthus ». *Ann. Inst. Pasteur*, **21**, 128.
- OTTO, R. (1907). Zur Frage der Serum ueber Empfindlichkeit. *Münch. Med. Wochschr.*, **55**, 166.
- OVARY, Z. et BIER, O. G. (1953 a). Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig and its relationship to the Arthus phenomenon. *J. Immunol.*, **71**, 6-11.
- OVARY, Z. et BIER, O. G. (1953 b). Action empêchante du sérum normal de Lapin sur l'anaphylaxie cutanée passive du Cobaye. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 443-445.
- SCHULTZ, W. H. (1910). Physiological studies in anaphylaxis. I. The reaction of smooth muscle of the guinea pig sensitized with horse serum. *J. Pharmacol.*, **1**, 549.
- WEIL, R. (1913). The nature of anaphylaxis and the relations between anaphylaxis and immunity. *J. med. Res.*, **27**, 497-527.

L'anaphylaxie passive *in vitro*

IV. — Les phénomènes d'interférence entre anticorps et gamma-globulines non spécifiques au cours de la sensibilisation passive *in vitro* *

PAR

P. LIACOPOULOS

[Centre de Recherches Allergiques et Immunologiques (1) (C.N.R.S., Institut National d'Hygiène et Association Claude-Bernard). Directeur : Pr B. N. Halpern].

Divers auteurs ont observé que la présence de gamma-globulines normales pouvait entraver la sensibilisation cutanée passive.

OVARY et BIER (1953 b) ont démontré que les concentrations d'anticorps nécessaires pour produire l'anaphylaxie passive cutanée chez le Cobaye sont de 50 à 100 fois plus élevées lorsque pour diluer l'immunsérum, on emploie le sérum normal homologue (Lapin) à la place du sérum physiologique (NaCl p. 1 000). Plus récemment, FISHER et COOKE (1957) ont confirmé ces résultats et montré que cet effet inhibiteur est dû uniquement à la fraction gamma-globulinique du sérum. BIOZZI, HALPERN et BINAGHI (1959) reprirent l'étude de ce phénomène. Ils ont pu montrer d'une part, qu'il existe, pour un certain degré d'inhibition, une relation constante entre la concentration des gamma-globulines normales et celle des anticorps et, d'autre part, que ce phénomène est spécifique. Le pouvoir inhibiteur des gamma-globulines varie en effet selon leur origine : les gamma-globulines de Lapin sont les plus compétitives envers les anticorps de Lapin, celles de Cobaye, d'Homme et de Rat le sont à un degré moindre et celles de Cheval sont sans effet.

La technique de la sensibilisation passive *in vitro* présente certains avantages sur l'anaphylaxie passive cutanée pour l'étude de ce phénomène : l'absence de drainage par la lymphe et le sang des globulines injectées localement ; la possibilité de changer à volonté la durée d'incubation. Nous avons pu ainsi aborder l'étude de ce problème d'une manière plus quantitative.

* Reçu le 3 mars 1962.

(1) Hôpital Broussais, 96, rue Didot, Paris (14^e).

TECHNIQUES

La même technique de sensibilisation passive *in vitro*, décrite précédemment (LIACOPOULOS, 1961), a été utilisée.

Au milieu standard de sensibilisation, contenant des anticorps de Lapin, ont été ajoutées des concentrations variables de gamma-globulines de diverses espèces animales. Des fragments d'intestin prélevés sur des cobayes normaux ont été placés dans ces solutions pendant des temps choisis, et ensuite ils ont été lavés, étalonnés à l'histamine et testés quant à l'intensité de leur réaction anaphylactique.

RÉSULTATS

a) Action des gamma-globulines non spécifiques de Lapin.

Dans ces conditions expérimentales la présence dans le milieu de sensibilisation, des gamma-globulines normales de Lapin à une concentration 100 fois plus élevée que celle des anticorps, avec une durée d'incubation de une heure, inhibe entièrement la sensibilisation (fig. 1).

Par contre, les globulines alpha et bêta à la même concentration et la sérum-albumine à une concentration 500 fois supérieure à celle des anticorps n'exercent aucun effet inhibiteur.

Ces phénomènes d'interférence entre anticorps et gamma-globulines non spécifiques qui se retrouvent aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* nous ont paru justifier une étude plus approfondie.

Deux séries d'expériences ont été effectuées. Dans la première, des quantités croissantes de gamma-globulines de Lapin ont été ajoutées à la même concentration d'anticorps. Dans la deuxième série, la concentration totale des gamma-globulines a été maintenue constante, tandis que la part des globulines anticorps était variable.

EFFET DES CONCENTRATIONS CROISSANTES GAMMA-GLOBULINES NON SPÉCIFIQUES.

Nous avons sensibilisé des fragments d'intestin avec la même quantité d'anticorps (5 μ g N/ml) en présence de quantités de gamma-globulines allant de 10 à 250 μ g N/ml. Pour chaque concentration de gamma-globulines la vitesse de sensibilisation a été établie en mesurant l'intensité de la réaction anaphylactique après des temps d'incubation échelonnés de 10 à 300 minutes. Nous avons ainsi constaté que les gamma-globulines dans les limites des concentrations employées n'inhibent pas la sensibilisation mais la ralentissent (fig. 2). Cette action peut être évaluée en recherchant la durée d'incubation nécessaire pour obtenir avec les différentes concentrations des gamma-globulines une réaction anaphylactique de la même importance que la réaction témoin. Nous pouvons alors constater que l'intensité de la réaction de sensibilisation est inversement proportionnelle à la

concentration des gamma-globulines normales présentes dans le milieu de sensibilisation. L'action des gamma-globulines n'apparaît pas comme une action inhibitrice mais comme une action de freinage puisque, d'une part, elle se manifeste

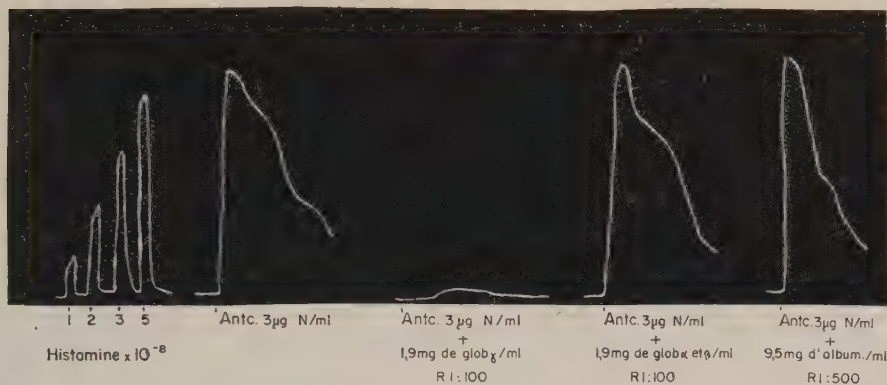


FIG. 1. — Contractions anaphylactiques de fragments d'intestin de Cobaye sensibilisés *in vitro* avec 3 μ g N/ml d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin pendant une heure. De gauche à droite 1° étalonnage à l'histamine (bichlorhydrate) ; 2° fragments d'intestin de référence ; 3° fragment d'intestin sensibilisé en présence de gamma-globulines normales de Lapin ; 4° fragment d'intestin sensibilisé en présence de globulines alpha et bêta de Lapin ; 5° fragment sensibilisé en présence d'albumine sérique de Lapin.

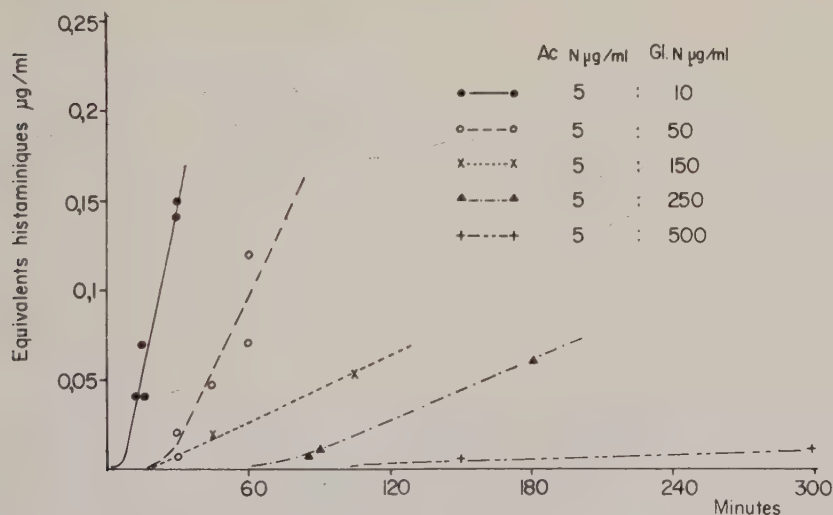


FIG. 2. — Influence de diverses concentrations de gamma-globulines non spécifiques de Lapin sur la cinétique de la sensibilisation *in vitro* de fragments du même intestin de Cobaye avec la même concentration d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin (5 μ g N/ml). Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

même avec des concentrations faibles, d'autre part, avec les fortes concentrations, la sensibilisation peut avoir lieu si on prolonge suffisamment la durée d'incubation. Ainsi avec un taux de gamma-globulines de 500 μ g N/ml, on inhibe la réaction.

tion anaphylactique si la durée de sensibilisation est d'une heure. Mais si on prolonge le contact pendant 2 à 4 heures la réaction anaphylactique devient nettement positive.

EFFET DES DOSES CROISSANTES D'ANTICORPS.

Nous avons vu précédemment (LIACOPOULOS, 1962) que l'importance de la sensibilisation est fonction de la durée de l'incubation et de la concentration en anticorps du milieu. La relation entre ces deux variables est la suivante :

$$C = f \frac{1}{t^2}$$

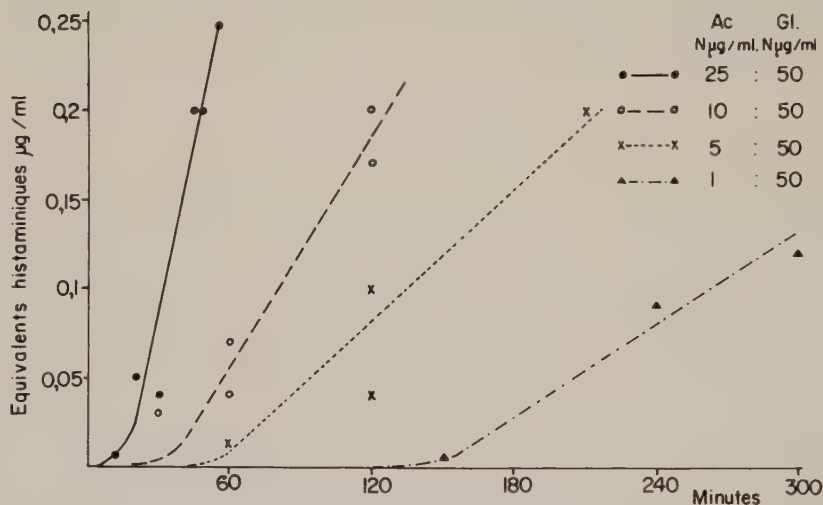


FIG. 3. — Influence de la concentration des anticorps de Lapin sur la cinétique de la sensibilisation de plusieurs fragments du même intestin de cobaye *in vitro*, en présence de la même concentration totale de gamma-globulines (anticorps inclus) 50 µg N/ml. Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

Mais l'immunsérum de Lapin que nous avons utilisé pour ces expériences contenait, comme tout immunsérum, des gamma-globulines non spécifiques à une concentration au moins aussi élevée que celle des anticorps. Par conséquent quand nous augmentons la quantité des anticorps dans le milieu la quantité des gamma-globulines normales augmente également.

Nous avons ainsi repris ces expériences, mais en ajoutant une quantité convenable de gamma-globulines normales aux différentes dilutions de l'immunsérum, de manière que la quantité totale des globulines (gamma-globulines normales + gamma-globulines anticorps) soit la même dans tous les cas. Ainsi la sensibilisation se faisait à concentration de globulines totales constantes, et à concentration d'anticorps variables.

Une telle expérience est représentée sur la fig. 3. La concentration totale des

globulines γ est de $50 \mu\text{g N/ml}$ et celle des anticorps varie de $1 \mu\text{g}$ à $25 \mu\text{g N/ml}$. Des résultats similaires ont été obtenus avec une concentration totale des gamma-globulines de 100 ou de $300 \mu\text{g N/ml}$.

L'analyse graphique de ces résultats montre qu'en présence d'une quantité constante de gamma-globulines la concentration d'anticorps nécessaire pour obtenir le même degré de sensibilisation est proportionnelle à l'inverse du temps d'incubation (fig. 4) : $\left(c = f \frac{1}{t}\right)$. Autrement dit, si on élimine le facteur de ralentissement que constituent les gamma-globulines (en le maintenant constant) la vitesse de sensibilisation est directement proportionnelle à la concentration des anticorps.

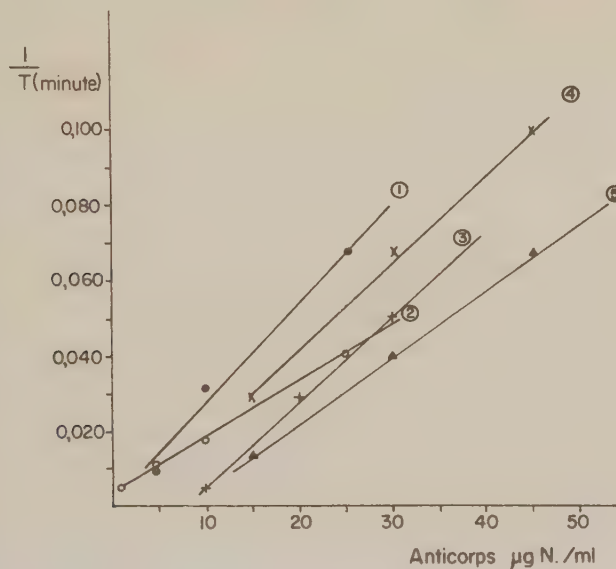


FIG. 4. — Relation entre la concentration d'anticorps et le temps d'incubation nécessaire pour obtenir la même contraction anaphylactique de fragments d'intestin sensibilisés *in vitro*, en présence de la même quantité de gamma-globulines totales (anticorps et gamma-globulines non spécifiques). Ordonnées : inverse du temps (en minutes) ; abscisses : concentrations d'anticorps. Concentration totale des gamma-globulines 1 et 2 : $50 \mu\text{g N/ml}$; 3 : $100 \mu\text{g N/ml}$, 4 et 5 : $300 \mu\text{g N/ml}$.

b) Variations de l'activité des gamma-globulines des différentes espèces animales.

Les gamma-globulines non spécifiques d'autres espèces animales sont aussi capables de ralentir le processus de sensibilisation par les anticorps de Lapin mais à un degré moindre que les gamma-globulines de Lapin. Des sensibilisations effectuées avec $5 \mu\text{g N/ml}$ d'anticorps de Lapin, en présence de $250 \mu\text{g N/ml}$ de gamma-globulines non spécifiques d'autres espèces animales montrent que les gamma-globulines de Lapin sont des plus actives (fig. 5) ; viennent ensuite par ordre d'activité celles de l'Homme et du Cobaye. Les gamma-globulines du Cheval, du

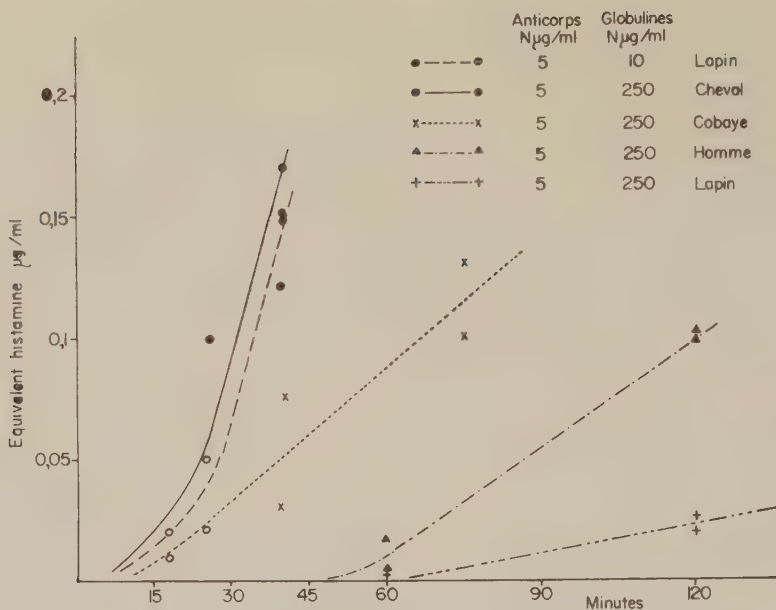


FIG. 5. — Influence des gamma-globulines non spécifiques de différentes espèces animales (250 µg N/ml) sur la cinétique de la sensibilisation de fragments d'intestin de Cobaye *in vitro* avec des anticorps antiovalbumines de Lapin (5 µg N/ml).
Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ;
abscisses : temps d'incubation.

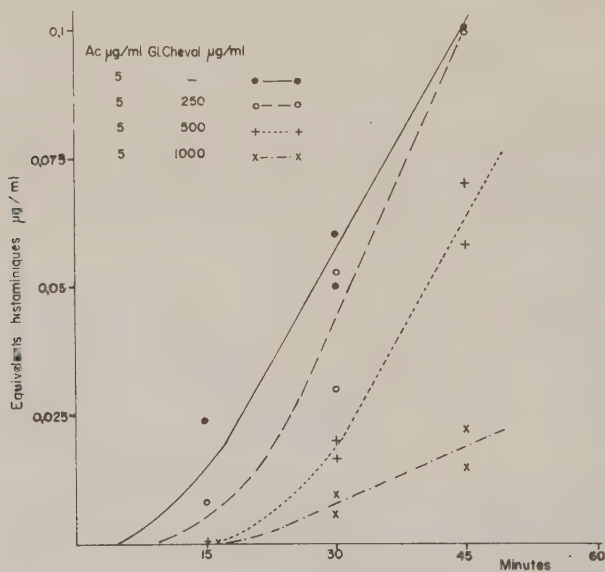


FIG. 6. — Influence de différentes concentrations de gamma-globulines non spécifiques de Cheval, sur la cinétique de la sensibilisation *in vitro*, des fragments d'intestin de Cobaye, avec la même concentration d'anticorps (5 µg N/ml) anti-ovalbumine de Lapin. Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

Bœuf, du Porc, du Poulet et de la Chèvre se montrent sans action sur la sensibilisation puisque leur courbe coïncide avec la courbe témoin.

Mais si on augmente la concentration des gamma-globulines apparemment inactives, elles aussi se montrent capables d'interférer avec les anticorps de Lapin. Nous voyons sur la fig. 6 l'illustration d'une expérience effectuée avec des gamma-globulines non spécifiques de Cheval. Pour la même dose d'anticorps ($5 \mu\text{g N/ml}$), des concentrations de gamma-globulines de $500 \mu\text{g N/ml}$ ou de $1000 \mu\text{g N/ml}$ se montrent aussi actives que les gamma-globulines de Lapin à des concentrations quatre fois moindres.

De cet ensemble d'expériences, il ressort que les gamma-globulines non spécifiques de toutes les espèces animales étudiées interfèrent avec les anticorps de Lapin au cours de la sensibilisation passive *in vitro*. Leur activité varie selon leur origine. Nos expériences nous permettent de les classer selon leur activité dans l'ordre suivant :

Lapin > Homme > Chien > Cobaye > Rat > Cheval > Bœuf > Porc > Poulet > Chèvre.

c) Influence des gamma-globulines normalement présentes dans l'intestin sur la sensibilisation passive *in vitro*.

Si telle est l'action des gamma-globulines homologues ou hétérologues sur le processus de sensibilisation, nous pouvons nous demander quelle influence exercent les propres gamma-globulines du Cobaye qui sont normalement présentes dans l'intestin.

Nous avons observé au cours de nos expériences que la cinétique de sensibilisation est différente si des fragments d'intestin provenant d'un même cobaye ont été employés immédiatement après le prélèvement ou après un séjour de quelques heures dans le liquide de Tyrode. Cette observation nous a amenés à étudier d'une manière systématique ce phénomène.

Nous avons sensibilisé des fragments d'intestin immédiatement après le prélèvement sur l'animal et d'autres fragments du même intestin après des lavages répétés et prolongés avec la solution de Tyrode soit à la température de 38°C pendant 4 à 6 heures, soit à la température de 5°C pendant 24 ou 48 heures.

A la suite des lavages, la vitesse de sensibilisation des organes isolés augmente considérablement par rapport à celle des organes non lavés. Cette différence peut être concrétisée soit par l'évaluation de la durée d'incubation nécessaire pour obtenir la même réaction anaphylactique avec la même concentration d'anticorps, soit par l'évaluation de la concentration en anticorps nécessaire pour obtenir la même réaction anaphylactique avec une durée d'incubation identique. Ainsi le temps d'incubation nécessaire pour obtenir une réponse anaphylactique donnée est de 3 à 4 fois plus court avec les organes lavés ; d'autre part pour obtenir la même réponse anaphylactique après le même temps d'incubation il faut réduire la concentration des anticorps dans le milieu de sensibilisation de 10 fois. Cette

augmentation de la vitesse de sensibilisation peut être obtenue après lavage soit pendant 6 heures à la température de 38°C, soit pendant 24 heures à la température de 5°.

Les lavages prolongés ne modifient pas la sensibilité des fragments d'intestins à l'histamine, et leur réactivité à l'anaphylatoxine n'est nullement altérée. Par ailleurs, si on sensibilise les fragments d'intestin immédiatement après le prélèvement et si on les soumet ensuite à des lavages prolongés non seulement on n'observe pas d'augmentation mais, au contraire, la réaction anaphylactique se trouve diminuée de 40 à 60 p. 100. En outre, si l'intestin après le prélèvement est conservé pendant les mêmes intervalles dans une chambre humide, sans contact avec du liquide, sa cinétique de sensibilisation est identique à celle d'un intestin sensibilisé immédiatement après le prélèvement.

Pour déterminer s'il s'agit bien d'un phénomène en relation avec la présence des gamma-globulines propres du Cobaye, nous avons étudié parallèlement les modalités de la désorption des globulines propres des organes isolés, concurremment avec les modifications de la vitesse de la sensibilisation après des lavages prolongés. A cet effet, nous avons injecté à des cobayes normaux 10 mg de gamma-globulines de Cobaye faiblement radiomarquées à l'iode ¹³¹. 48 heures plus tard, les animaux ont été sacrifiés et l'iléon de chaque cobaye prélevé et découpé en plusieurs fragments répartis en quatre groupes. Les fragments du premier groupe ont été sensibilisés *in vitro* immédiatement après le prélèvement, ceux du deuxième groupe ont été soumis à des lavages répétés à la température de 38°C et sensibilisés après différents temps de lavage, les fragments du troisième groupe ont été lavés à la température de 5° pendant 24 à 48 heures et les fragments du quatrième groupe ont été placés immédiatement après prélèvement dans une chambre humide à la température de 5° pendant 24 heures. Les organes de ces deux derniers groupes ont été ensuite également sensibilisés avec la même concentration d'anticorps (5 µg N/ml). Des mesures de radioactivité et de vitesse de sensibilisation des morceaux des quatre groupes ont été effectuées simultanément. Les résultats sont rapportés dans le tableau I.

On peut constater que, à mesure que la radioactivité résiduelle des fragments d'intestin diminue, le temps d'incubation nécessaire pour conférer à un fragment d'intestin un certain degré de sensibilisation diminue parallèlement. C'est-à-dire que, la désorption des gamma-globulines de l'intestin est en relation avec l'augmentation de la vitesse de sensibilisation.

En ce qui concerne les fragments placés dans la chambre humide, on n'observe pas de variation de la vitesse de sensibilisation, malgré la perte d'une partie de la radio-activité. Mais cette diminution de la radio-activité résiduelle doit être attribuée à l'expulsion de sécrétion de la muqueuse car elle est accompagnée par une diminution du poids de l'intestin de 5 à 8 p. 100. Par conséquent la concentration des gamma-globulines à l'intérieur de l'intestin reste la même bien qu'on en retrouve une partie dans le liquide de la chambre humide.

Pour vérifier si l'augmentation de la vitesse de sensibilisation est effectivement due à la désorption des gamma-globulines, des fragments d'intestin ont été lavés

TABLEAU I. — *Effet du lavage prolongé des intestins isolés de Cobaye sur leur aptitude à se sensibiliser passivement in vitro **.

Traitement	Durée	Radioact. (moyenne)	Temps d'incubation** (en minutes)										Moyenne
Nul	—	100	30	45	90	50	45	70	90	100	50	63	
Lavage dans sol. de Tyrode à 38°C..	60 m	65										33	
	120 m	50		32									
	240 m	40	8		45				45				
Lavage dans sol. de Tyrode à 5°....	24 h	28	16	8		15	12	17	35	50	8	20	
	48 h	20	9			10				20		13	
Chambre humide à 5°.....	4 h	93					50	70				60	
	24 h	62	45	45		40	47	45	52	75	60	51	

* Sensibilisation avec 5 µg N d'anticorps/ml.

** Temps d'incubation nécessaire pour obtenir une contraction anaphylactique équivalente à 0,1 µg de bichlorhydrate d'histamine/ml. Chaque colonne comprend des fragments prélevés sur le même iléon.

avec de la solution de Tyrode additionnée de différentes concentrations de gamma-globulines de Cobaye, pendant 24 heures à 5°C, et ensuite sensibilisés. Les résultats, rapportés sur la fig. 7, indiquent que la vitesse de sensibilisation de l'intestin lavé dans ces conditions se rapproche de celle de l'organe non lavé, à mesure que la concentration des gamma-globulines dans le liquide de lavage augmente ; à la concentration de 200 à 250 µg N/ml elle est similaire à celle de l'intestin non lavé, sensibilisé immédiatement après prélèvement. Une concentration plus élevée des gamma-globulines dans le liquide diminue la vitesse de sensibilisation.

Il semblerait ainsi que les gamma-globulines normalement présentes dans le tissu soient en équilibre avec une solution de Tyrode contenant 200 à 250 µg N/ml de gamma-globulines par ml. Ceci est vérifié par le fait que, si on sensibilise les fragments d'intestin lavés pendant 24 heures à 5°C avec 5 µg N d'anticorps/ml en présence de gamma-globulines de Cobaye à la concentration de 200 à 250 µgN/ml la vitesse de sensibilisation revient à sa valeur initiale c'est-à-dire à celle des fragments non lavés. Les mêmes résultats sont obtenus si, aux solutions de gamma-globulines, on substitue des solutions de sérum entier de Cobaye, à condition que celles-ci contiennent les mêmes quantités de gamma-globulines. Il s'agit donc bien d'un effet lié à la concentration des gamma-globulines et non à celle des protéines totales du sérum.

L'ensemble de ces données expérimentales montrent que les modifications de la vitesse de sensibilisation enregistrées au cours des lavages prolongés des fragments d'intestin, sont directement reliées à la concentration résiduelle des gamma-globulines normalement présentes dans le tissu.

DISCUSSION

L'ensemble de nos expériences montre que la sensibilisation passive *in vitro* des organes isolés de Cobaye, et en particulier des fragments d'iléon, est une méthode féconde pour l'étude du mécanisme de la sensibilisation tissulaire.

Il est généralement admis, que la sensibilisation passive, générale ou locale, relève du même mécanisme que la sensibilisation active. D'après les résultats obtenus par la sensibilisation passive *in vitro*, les modalités de sensibilisation, ne diffèrent guère que celle-ci soit réalisée *in vivo* ou *in vitro*.

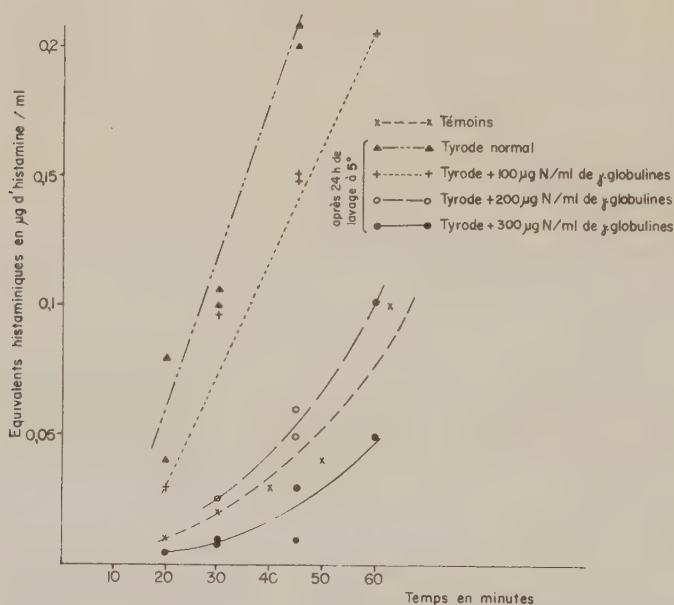


FIG. 7. — Influence des différentes concentrations de gamma-globulines non spécifiques de Cobaye, présentes dans le liquide de lavage, sur la cinétique de sensibilisation *in vitro* des fragments d'intestin de Cobaye, avec la même concentration d'anticorps ($5 \mu\text{g N/ml}$) anti-ovalbumine de Lapin. Ordonnées : réponses anaphylactiques exprimées en équivalents d'histamine (bichlorhydrate) ; abscisses : temps d'incubation.

Nous avons montré qu'il existe un rapport direct entre la concentration d'anticorps et l'importance de la sensibilisation *in vitro*, le même rapport existe entre la quantité d'anticorps injectée et l'importance du choc anaphylactique du Cobaye (KABAT et LANDOW, 1942) ou de la réaction cutanée (OVARY et BIER, 1953).

De même, la période de latence qui correspond à la période d'incubation, nécessaire pour obtenir une réponse anaphylactique déterminée, est inversement proportionnelle à la quantité d'anticorps utilisée et elle peut être réduite à quelques minutes, comme l'a également observé KULKA (1943). La même relation se retrouve en anaphylaxie passive générale (BENACERRAF et KABAT, 1949) et cutanée (OVARY et BIER, 1953).

Le ralentissement de la sensibilisation *in vitro* par la présence de gamma-globulines normales dans le milieu se retrouve également *in vivo* au cours de l'anaphylaxie passive cutanée (BIOZZI, HALPERN et BINAGHI, 1959).

Mais les comparaisons que nous pouvons faire entre la sensibilisation passive *in vitro* et la sensibilisation passive *in vivo* ne peuvent guère s'étendre très loin, car il est impossible de faire varier les conditions de sensibilisation *in vivo* aussi largement que nous pouvons le faire *in vitro*. La méthode de sensibilisation passive *in vitro* nous a permis d'étudier l'influence de nombreux facteurs sur le mécanisme de sensibilisation et d'en tirer des renseignements nouveaux sur la nature même de ce phénomène.

Pour expliquer le mécanisme intime de l'anaphylaxie, deux théories s'affrontent depuis le début de ce siècle : la théorie humorale introduite par FRIEDBERGER (1909), FRIEDMANN (1909) et reprise plus récemment par ROCHA E SILVA (1952, 1957) et la théorie cellulaire introduite par DALE (1913) et WEIL (1913) (pour littérature complète, voir TOPLEY et WILSON, 1946).

La théorie humorale admet que l'union antigène-anticorps se produit dans la circulation et les liquides interstitiels, ce qui provoque la formation d'anaphylatoxine. Celle-ci agissant sur les cellules provoque la libération de l'histamine et d'autres substances pharmacologiquement actives qui déterminent les manifestations cliniques de l'anaphylaxie.

La théorie humorale a suscité de nombreuses critiques et elle n'a aujourd'hui que peu d'adeptes. En particulier :

a) La formation de l'anaphylatoxine n'a aucune spécificité : elle se forme par l'action sur un sérum normal de facteurs aussi variés que le précipité spécifique antigène-anticorps, le kaolin, l'amidon, l'agar agar, le dextran, le talc, le sulfate de baryum, l'inuline ;

b) Dernièrement MOTA (1959) a apporté un argument décisif contre la théorie humorale en montrant qu'un fragment d'intestin chauffé à 45° pendant une demi-heure, qui n'est plus capable de produire une contraction anaphylactique (MONGAR et SCHILD, 1957) se contracte normalement avec l'histamine et réagit à l'anaphylatoxine de la même manière qu'un intestin non chauffé ; ainsi l'anaphylatoxine pourrait être classée parmi les nombreuses substances histamino-libératrices que nous connaissons aujourd'hui, mais dont le mode d'action diffère de celui de l'anaphylaxie.

La théorie cellulaire, en revanche, a presque réalisé l'unanimité des spécialistes parce qu'elle rend compte de quelques faits essentiels de l'anaphylaxie :

a) La nécessité d'une période de latence entre l'injection des anticorps et le moment où la réaction anaphylactique atteint son maximum, quand le taux d'anticorps dans la circulation est bien diminué par rapport à celui qu'on observe immédiatement après l'injection.

b) L'effet protecteur d'un excès d'anticorps circulants ;

c) La persistance des anticorps au lieu de l'injection locale (cutanée) plusieurs jours et même, en ce qui concerne l'Homme, plusieurs semaines ;

d) Une perfusion des organes sensibilisés, ou un lavage des organes isolés ne désensibilise pas ces organes ;

e) Il existe une spécificité quant au pouvoir des anticorps d'une espèce animale de sensibiliser un animal d'une autre espèce : on peut sensibiliser le Cobaye avec les anticorps de Lapin mais pas avec les anticorps de Cheval, etc...

La théorie cellulaire admet que les anticorps injectés dans la circulation ou introduits dans le liquide ambiant d'un organe isolé en survie, pénètrent dans les tissus et se fixent sur la surface ou même entrent dans les cellules. Lorsque l'antigène arrive, ce sont uniquement les anticorps fixés qui déterminent la réaction anaphylactique par activation d'une chaîne enzymatique intracellulaire qui aboutit à la libération d'histamine et d'autres substances actives. La fixation des anticorps doit se faire par une liaison assez solide parce qu'ils ne peuvent pas se détacher par lavage ou perfusion ou drainage de la lymphe. Cette liaison doit être spécifique puisque seulement les anticorps de certaines espèces peuvent se fixer sur les cellules d'un animal donné. Cette théorie conduit à penser qu'il y aurait sur les cellules, tout au moins sur les cellules capables de libérer l'histamine, un nombre de récepteurs spécifiques sur lesquels viennent se fixer les anticorps capables de produire l'anaphylaxie.

A la lumière de ces théories sur le mécanisme de la sensibilisation et notamment la théorie cellulaire, puisque la théorie humorale n'implique pas de stade de sensibilisation, nous allons discuter les renseignements tirés de nos expériences.

Nous avons confirmé, au cours de nos expériences, l'existence d'une période de latence pour obtenir la sensibilisation de l'intestin isolé avec une concentration donnée d'anticorps. La longueur de cette période de latence (ou période d'incubation) est fonction de la concentration d'anticorps utilisée. Avec de fortes concentrations, elle peut être réduite jusqu'à quelques minutes et sans doute davantage si on disposait d'une solution d'anticorps très concentrée. BENACERRAF et KABAT (1949) ont montré qu'il est possible de produire un choc anaphylactique régulièrement mortel en injectant 1 mg N d'anticorps par voie intraveineuse, 30 minutes après cette injection. Avec 2 mg N d'anticorps un choc important et quelquefois mortel peut être obtenu en injectant l'antigène immédiatement après l'injection des anticorps. Ainsi, la période de latence peut être réduite presque indéfiniment si on dispose d'un sérum assez riche en anticorps. Mais pour réduire le temps de latence de moitié, il faut augmenter de 4 fois la concentration d'anticorps suivant la formule précédemment établie $\left(C = f \frac{1}{t^2}\right)$.

Si la fixation des anticorps sur les cellules nécessite un certain temps pour s'accomplir, cet intervalle peut être considérablement réduit et même annulé suivant la concentration des anticorps employés.

L'influence que la température exerce sur le processus de sensibilisation paraît considérable. Si on abaisse la température de 38°C à 10°C la vitesse de sensibilisation diminue de 30 fois environ (cf. p. 506). Mais la sensibilisation peut se faire même à une température voisine de 0°C, ce qui semble indiquer que la fixation

des anticorps n'est pas une réaction enzymatique. Nous pouvons rapprocher de cette déduction l'observation de MONGAR et SCHILD (1960) selon laquelle la sensibilisation passive n'est pas inhibée par une variété d'inhibiteurs enzymatiques tels que cyanure, fluorure, dinitrophénol, phénol, etc... Nous n'avons pas pu étudier l'effet des températures plus élevées que la température physiologique (38°C à 40°C) parce qu'un fragment d'intestin chauffé à 45°C pendant 30 minutes ne donne plus de réaction anaphylactique (MONGAR et SCHILD, 1957).

L'effet favorisant d'un milieu non électrolytique sur le processus de sensibilisation pourrait être expliqué de différentes façons. Les molécules protéiniques comportent sur leur surface de nombreuses charges électriques positives et négatives. Lorsque ces molécules sont en solution dans un milieu non électrolytique, leurs propriétés physico-chimiques ne sont pas les mêmes que dans un milieu à force ionique élevée, par exemple la solution de Tyrode. Il se pourrait que dans ces conditions la liaison entre anticorps et cellules, c'est-à-dire la fixation, soit facilitée. Il serait également possible que des interactions se produisent en milieu électrolytique normal ($N : 0,15$) entre les molécules protéiniques ; ces interactions peuvent diminuer avec la force ionique du milieu. Il en résulterait un accroissement de la vitesse de la diffusion des molécules d'anticorps et par conséquent une accélération de la sensibilisation. Quoi qu'il en soit, l'effet de la concentration des ions d'hydrogène, c'est-à-dire du pH , qui est perceptible seulement en milieu non électrolytique, apporte un argument supplémentaire en faveur de l'intervention des charges électriques dans le processus de sensibilisation.

Un mécanisme similaire pourrait être évoqué pour expliquer le mode d'action de l'urée. Il est connu que l'urée, suivant sa concentration, rompt ou diminue les liaisons entre les molécules protéiniques (liaison antigène-anticorps) ou entre les molécules protéiniques et les molécules d'eau de la solution. En agissant ainsi l'urée faciliterait la diffusion des anticorps à travers les structures tissulaires pendant la période de la sensibilisation.

L'action des gamma-globulines non spécifiques paraît être d'un grand intérêt pour la compréhension du mécanisme de la sensibilisation. MONGAR et SCHILD (1960), qui ont également observé ce phénomène, l'interprètent comme une preuve en faveur de la théorie cellulaire et de l'existence des récepteurs cellulaires spécifiques.

Pourtant il y a certains faits qui ne peuvent pas s'expliquer si on admet l'existence des récepteurs cellulaires spécifiques, même en très grand nombre : dans ce cas, en effet, les faibles concentrations des gamma-globulines devraient être sans action puisqu'il y aurait assez de place pour les anticorps et les gamma-globulines ; or, nous avons vu que l'action de freinage des gamma-globulines est proportionnelle à leur concentration et s'exerce même avec des concentrations très faibles. Si par contre le nombre des récepteurs est limité, il devrait se produire, à partir d'une certaine concentration de gamma-globulines, une inhibition définitive de la sensibilisation ; mais, ainsi que MONGAR et SCHILD (1960) l'ont également observé, même avec de fortes concentrations de gamma-globulines (cent fois plus élevées, par exemple, que celles des anticorps) il n'y a pas d'inhibition vraie mais

un ralentissement très important de la sensibilisation ; si on attend assez longtemps, quelques heures, l'organe isolé se sensibilise même en présence des fortes concentrations de gamma-globulines. Ceci, en particulier, doit être le cas de l'anaphylaxie passive *in vivo* où 30 μ g d'azote d'anticorps suffisent pour sensibiliser un cobaye de 250 g en 48 heures (KABAT et LANDOW, 1942) ; dans ces conditions la concentration des anticorps dans le plasma au moment de l'injection est de 3 μ g d'azote par ml et celle des gamma-globulines normales du Cobaye, de 1500 μ g d'azote environ. Nous avons vu, en effet, que les gamma-globulines normalement présentes dans les tissus de l'animal entravent la sensibilisation, celle-ci étant considérablement plus accélérée chez les organes longuement lavés avant la sensibilisation. MONGAR et SCHILD (1960) ont également observé que le poumon se sensibilise beaucoup plus efficacement lorsqu'il est bien perfusé avant la sensibilisation.

Par ailleurs, la propriété que possèdent à divers degrés les gamma-globulines des différentes espèces animales de freiner la sensibilisation des tissus de Cobaye, ne paraît pas être en rapport avec le pouvoir de sensibilisation que possèdent les anticorps de ces mêmes espèces animales, vis-à-vis des tissus de Cobaye : les anticorps humains ont un pouvoir sensibilisant 50 à 100 fois moindre (OVARY, 1954) que les anticorps de Cobaye, pourtant les gamma-globulines humaines sont nettement plus actives que les gamma-globulines de Cobaye ; les anticorps de Cheval sont incapables de sensibiliser le Cobaye (HUMPHREY et MOTA, 1959, OVARY, 1960) mais les gamma-globulines de cette espèce animale à une concentration adéquate, sont capables d'entraver la sensibilisation ; il en est de même pour les gamma-globulines de Bœuf, de Porc, de Poulet et de Chèvre dont les anticorps ne sensibilisent pas le Cobaye.

Le mode d'action des gamma-globulines normales reste donc incertain. Quelques renseignements peuvent néanmoins être tirés de l'expérience dans laquelle nous avons étudié la vitesse de la sensibilisation en fonction de la concentration d'anticorps, la quantité totale de globulines (anticorps + gamma-globulines non spécifiques) étant constante. Nous avons vu que, dans ces conditions, la concentration d'anticorps nécessaire pour obtenir une réponse constante est fonction de l'inverse du temps $\left(c = f \frac{1}{t}\right)$.

Ce résultat est apparemment discordant avec l'observation citée plus haut que la concentration d'anticorps nécessaire pour obtenir une réponse constante est proportionnelle à l'inverse du carré du temps $\left(c = f \frac{1}{t^2}\right)$.

Mais dans ce dernier cas, la concentration totale des globulines augmente avec la concentration des anticorps. Or, d'après l'équation établie, lorsqu'on double la concentration des anticorps, le temps de sensibilisation nécessaire, pour obtenir une réaction anaphylactique donnée, diminue, non pas de moitié mais seulement du quart. Cela signifie que l'augmentation de la concentration totale des gamma-globulines freine, dans une certaine mesure, l'accroissement escompté de la vitesse de sensibilisation.

Et pour compenser cet effet, on doit quadrupler la concentration des anticorps pour diminuer de moitié le temps de sensibilisation. Si cet effet ne se manifeste pas dans l'expérience où la concentration des globulines est constante, c'est parce qu'il est identique quelles que soient les dilutions d'anticorps.

Il semble ainsi, que toutes les molécules des gamma-globulines, anticorps ou gamma-globulines non spécifiques présentent des interactions qui deviennent plus importantes à mesure que leur concentration s'accroît.

Nous ne savons pas comment expliquer ce phénomène. Nous pouvons néanmoins faire un rapprochement avec le fait observé par LUNDGREN (1936, 1939). Cet auteur, étudiant le comportement de différentes protéines (thyroglobuline, pseudoglobuline antidiphthérique, nucléohistone thymique), à l'ultracentrifugation, a constaté que dans les solutions de protéines homogènes, il y a un équilibre entre molécules associées entre elles et molécules libres. Une série de facteurs peuvent favoriser la dissociation des molécules et augmenter la proportion des molécules libres par rapport aux molécules associées (ionisation de la protéine). Il est intéressant de constater que ces facteurs sont : la diminution de la concentration des protéines, l'abaissement de la force ionique du milieu, l'augmentation de la température, l'urée, facteurs qui, tous, comme nous l'avons vu, augmentent la vitesse de la sensibilisation. On pourrait ainsi faire la supposition que l'augmentation de la dissociation augmente l'activité des molécules des globulines et en particulier celle des anticorps, soit parce que les molécules libres (dissociées) diffusent plus facilement, soit parce qu'elles seules peuvent engendrer l'anaphylaxie.

Cependant, nous ne pouvons qu'évoquer cette hypothèse, car les conditions expérimentales de LUNDGREN (1939) sont différentes des nôtres, notamment les concentrations employées par cet auteur sont de l'ordre de 3 p. 100 environ, c'est-à-dire de 5 mg N/ml environ, tandis que les nôtres sont bien moindres. Mais nos résultats sont assez cohérents dans la gamme des concentrations employées qui s'étendent de 0,016 μ g N/ml (sensibilisation après incubation de 8 heures) à 1000 μ g N/ml (interférences des globulines de Cheval).

Nous pensons que l'on est en droit de retenir cette hypothèse à défaut d'une autre, puisque nous avons vu à quelles difficultés se heurte la conception d'un processus de compétition entre anticorps et gamma-globulines pour les hypothétiques récepteurs cellulaires.

RÉSUMÉ

Les gamma-globulines non spécifiques, introduites dans le milieu de sensibilisation contenant des anticorps de Lapin, interfèrent avec le processus de sensibilisation passive *in vitro*.

Cet effet, commun aux gamma-globulines de toutes les espèces animales étudiées, est cependant d'une importance variable suivant l'origine zoologique des gamma-globulines. Vis-à-vis des anticorps de lapin, l'effet inhibiteur des gamma-globulines décroît dans l'ordre suivant : Lapin, Homme, Chien, Cobaye, Rat, Cheval, Bœuf, Porc, Poulet, Chèvre.

Les gamma-globulines propres des animaux, normalement présentes dans les tissus, interfèrent également avec le processus de sensibilisation. En lavant longuement les organes dans la solution de TYRODE avant l'incubation avec les anticorps, leur taux de gamma-globulines diminue et la vitesse de leur sensibilisation augmente considérablement.

SUMMARY

Anaphylaxis passively induced *in vitro*.

IV. — Antibody inhibition by non-specific gamma-globulins during passive sensitization *in vitro*.

Non-specific gamma-globulins, when added to the incubating medium containing rabbit antibody, have been found to interfere with the process of passive *in vitro* sensitization.

Although this effect has been observed with all the gamma-globulins studied, there is a marked difference in the degree of interference produced, depending upon their zoological origin. When rabbit antibody is used for sensitization, the inhibitory effect decreases in the following order : rabbit, man, dog, guinea pig, rat, horse, beef, pig, chicken and goat.

Gamma-globulin normally present in the tissues also interferes with the sensitization process. When the tissue is bathed in Tyrode solution before incubation with antibody, its gamma-globulin content reduced and the sensitization process is markedly increased.

BIBLIOGRAPHIE

- BENACERRAF, B. et KABAT, E. A. (1949). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. — V. The latent period in passive anaphylaxis in its relation to the dose of rabbit anti-ovalbumine. *J. Immunol.*, **62**, 517-522.
- BIOZZI, G., HALPERN, B. et BINAGHI, R. (1959). — The competitive effect of normal serum proteins from various animal species on antibody fixation in passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig. *J. Immunol.*, **82**, 215-218.
- DALE, H. H. (1913). The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. *J. Pharmacol.*, **4**, 167-223.
- FISHER, J. P. et COOKE, R. A. (1957). Passive cutaneous anaphylaxis (P.C.A.) in the guinea pig. *J. Allergy*, **28**, 150-169.
- FRIEDBERGER, E. (1909). Kritik der Theorien über die Anaphylaxie. *Z. Immunitätsforsch.*, **2**, 208-224.
- FRIEDMANN, U. (1909). Weitere Untersuchungen über den Mechanismus der Anaphylaxie. *Z. Immunitätsforsch.*, **2**, 591.
- HUMPHREY, J. H. et MOTA, I. (1959). — The mechanism of anaphylaxis : observations on the failure of antibodies from certain species to sensitize guinea pig in direct and reversed passive anaphylaxis. *Immunology*, **2**, 19-30.
- KABAT, E. A. et LANDOW, W. (1942). A quantitative study of passive anaphylaxis in the guinea pig. *J. Immunol.*, **44**, 69-74.
- KULKA, A. M. (1943). Studies on antibody-antigen mixtures. — II. The effect of normal living excised tissue and its dependance on the presence of free antibody in the mixture. *J. Immunol.*, **46**, 235-238.

- LIACOPOULOS, P. (1961). L'anaphylaxie passive *in vitro*. — I. La méthode de sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **53**, 825-835.
- LIACOPOULOS, P. (1962). L'anaphylaxie passive *in vitro*. — III. Modalités de la sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **54**, 501-516.
- LUNDGREN, H. P. (1936). Association and dissociation reactions of thyro-globulin. *Nature, London*, **138**, 122.
- LUNDGREN, H. P. (1939). Protein stability as revealed by ultracentrifugal analysis. *Nature, London*, **143**, 896.
- MONGAR, J. L. et SCHILD, H. O. (1957). Effect of temperature on the anaphylactic reaction. *J. Physiol., London*, **135**, 320-338.
- MONGAR, J. L. et SCHILD, H. O. (1960). A study on the mechanism of passive sensitization. *J. Physiol., London*, **150**, 546-564.
- MOTA, I. (1959). The mechanism of action of anaphylatoxin. Its effects on guinea pig mast cells. *Immunology*, **2**, 403-413.
- OVARY, Z. (1960). Reverse passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig with horse, sheep or hen antibodies. *Immunology*, **3**, 19-27.
- OVARY, Z. et BIER, O. G. (1953 *a*). Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig and its relationship to the Arthus phenomenon. *J. Immunol.*, **71**, 6-11.
- OVARY, Z. et BIER, O. G. (1953, *b*). Action empêchante du sérum normal de Lapin sur l'anaphylaxie cutanée passive du Cobaye. *Ann. Inst. Pasteur*, **84**, 443-445.
- ROCHA E SILVA, M. (1954). Anaphylatoxin and histamine release. *Quart. Rev. All. appl. Immunol.*, **8**, 220.
- ROCHA E SILVA, M. et ARONSON, M. (1952). Histamine release from the perfused lung of the guinea pig by serotoxin (anaphylatoxin). *Brit. J. exp. Path.*, **33**, 577-586.
- TOBLEY, W. W. C., et WILSON, G. S. (1946). *The principles of bacteriology and immunity*. Ed. Edward Arnold and Co, London, 3^e édition, **II**, 1143-1145.
- WEIL, R. (1913). The nature of anaphylaxis and the relations between anaphylaxis and immunity. *J. med. Res.*, **27**, 497-527.
-

L'anaphylaxie passive *in vitro*

V. — Essais de désensibilisation des tissus sensibilisés *

PAR

P. LIACOPOULOS

[*Centre de Recherches Allergiques et Immunologiques (C.N.R.S., Institut National d'Hygiène et Association Claude Bernard). Directeur : Pr B. N. Halpern, Hôpital Broussais (1).*]

On sait que, si l'on injecte à un animal sensibilisé une quantité suffisante de l'antigène correspondant, l'animal, après le déroulement des troubles anaphylactiques, entre dans une période réfractaire pendant laquelle l'injection de l'antigène ne provoque aucune manifestation. Cet animal est désensibilisé. Il redevient sensible à l'antigène quelques jours plus tard (5 à 7) lorsque de nouveaux anticorps auront été produits. Il en est de même avec les tissus isolés en survie : l'introduction de l'antigène dans le milieu de survie, après le déclenchement de la réaction anaphylactique rendra l'organe insensible à une nouvelle addition d'antigène. Il est possible de le sensibiliser à nouveau, mais à la condition d'ajouter dans le milieu de survie une quantité suffisante d'anticorps.

Cette désensibilisation est due à la neutralisation des anticorps par l'antigène correspondant. Elle est spécifique, aucun autre antigène ne peut la déterminer.

En dehors de cette désensibilisation spécifique par l'antigène correspondant, peut-on désensibiliser un tissu au moyen d'un autre traitement ?

Autrement dit, le processus de sensibilisation est-il réversible ?

Nous avons vu précédemment qu'il est possible de sensibiliser passivement un tissu isolé en introduisant simplement les anticorps dans le milieu de survie. Il est également possible de sensibiliser un animal en injectant les anticorps dans la circulation. Si les anticorps sont capables de rendre, plus ou moins rapidement, sensible un animal ou un tissu isolé, par leur seule présence, il devrait être possible de désensibiliser le tissu de l'animal par une perfusion ou un lavage avec une solution physiologique.

* Reçu le 10 mars 1962.

(1) 96, rue Didot, Paris (XIV^e).

DALE (1913), le premier, a perfusé avec un litre de solution de Locke pendant 30 minutes à 1 heure, l'utérus d'un cobaye sensibilisé avec du sérum de Cheval. Il a constaté qu'à la fin de cette perfusion, l'organe se contracte à la suite de l'introduction de l'antigène aussi violemment que l'utérus non perfusé. Cette observation, confirmée par de nombreux auteurs, semble montrer que les anticorps sensibilisants sont solidement attachés aux éléments tissulaires, notamment aux cellules, et fut un des arguments principaux de la théorie cellulaire.

FREUND (1927) a étudié la cinétique de l'accumulation des anticorps dans les tissus des lapins après l'injection intraveineuse d'un immunsérum de Lapin. Il a constaté que les anticorps pénètrent lentement les tissus et y atteignent leur taux maximal, seulement 17 à 24 h après l'injection. Ensuite il a perfusé la peau et l'utérus des lapins ainsi sensibilisés en utilisant la méthode de DALE (1913). Le dosage des anticorps tissulaires après la perfusion montrait que, chez les lapins sacrifiés moins de 17 h après l'injection de l'immunsérum et ensuite perfusés, le taux des anticorps tissulaires diminue considérablement, tandis que chez des lapins sacrifiés 17 h ou plus après l'injection, la perfusion n'entraîne pas les anticorps tissulaires. Le même auteur (FREUND et WHITNEY, 1928) a également constaté que les anticorps qui ne sont pas entraînés par la perfusion peuvent être enlevés des tissus perfusés après broyage avec du sable et extraction avec une solution saline. Cet auteur en déduit que les anticorps ne s'attachent pas sur les cellules ou les autres constituants tissulaires.

Si les anticorps pendant la phase de sensibilisation, n'atteignent leur taux maximal dans les tissus qu'en 17 à 24 h, leur élution lors de la perfusion ne peut être manifeste que lorsque celle-ci dure au moins aussi longtemps, ce qui est, techniquement, très difficile à réaliser.

Des études réalisées *in vivo* avec la méthode de l'anaphylaxie passive cutanée chez le Cobaye (OVARY et BIER, 1953) montrent que la persistance des anticorps de Lapin au lieu de l'injection est limitée. Leur présence ne peut y être décelée que pendant 6 à 48 h suivant la dose injectée. Utilisant des anticorps de Cobaye, CHANDLER et coll. (1959) ont constaté que ces anticorps persistent au lieu de l'injection jusqu'à 72 à 96 h après leur injection. Chez la Souris ces délais sont beaucoup plus courts : la présence des anticorps de Lapin ou de Souris dans le site de l'injection intradermique ne peut être démontrée que jusqu'à 6 h après l'injection ; 24 ou même 12 h après, leur recherche est négative (OVARY, 1958 ; MUNOZ et coll., 1959).

Ces expériences d'anaphylaxie passive cutanée montrent que la persistance des anticorps dans le lieu de l'injection est plus ou moins longue mais non définitive. Un processus de diffusion lente existe, qui permet le drainage des anticorps injectés localement.

En revanche, chez l'Homme, les anticorps allergiques injectés dans le derme persistent beaucoup plus longtemps au lieu même de l'injection. Les réactions de PRAUSNITZ-KÜSTNER se révèlent couramment positives jusqu'à 3 à 4 semaines après l'injection des anticorps. Ce délai qui correspond approximativement à la durée de vie moyenne des globulines-anticorps (DIXON et coll., 1952), montre

que les anticorps allergiques ou réagines, demeurent longtemps dans le lieu de l'injection sans diffuser et sans être entraînés par le courant circulatoire et lymphatique. Récemment, RAPPAPORT (1960) a rapporté que les anticorps allergiques pénétraient à l'intérieur des cellules des différents éléments et couches cutanés. Cette pénétration intracellulaire expliquerait la fixité des anticorps allergiques au lieu même de leur injection.

De l'ensemble de ces observations, il ressort que dans les cas des réagines, chez l'Homme, une liaison solide entre les anticorps et les cellules, s'établit au cours de la sensibilisation. Chez les animaux, la durée relativement courte de la persistance des anticorps sensibilisants *in situ* milite plutôt en faveur d'une liaison labile des anticorps injectés localement.

A la lumière de ces faits, et en utilisant des fragments d'intestin de Cobaye, sensibilisés passivement *in vitro* avec des anticorps de Lapin anti-ovalbumine, nous avons entrepris l'étude de la réversibilité de la sensibilisation anaphylactique. La première partie de cette étude est consacrée aux modalités de la désorption des anticorps et des gamma-globulines, adsorbées sur les fragments d'intestin pendant la sensibilisation passive *in vitro* ou *in vivo*, à la suite de lavages prolongés. En même temps nous avons étudié l'évolution du degré de sensibilisation des organes longuement lavés.

Nous passons ensuite à l'étude des différents traitements autres que l'introduction de l'antigène spécifique, qui se sont montrés capables de désensibiliser, entièrement ou partiellement, des organes préalablement sensibilisés.

TECHNIQUES

A la technique de la sensibilisation passive décrite précédemment (LIACOPOULOS, 1961), certaines variantes ont été adoptées pour permettre l'étude du processus de désensibilisation :

a) Dans plusieurs cas, la sensibilisation passive a été effectuée *in vitro* ou *in vivo* avec des anticorps de Lapin marqués à l'iode radioactif (I^{131}). — La fraction gamma-globulinique d'un immunosérum a été précipitée avec du SO_4Na_2 à 18 p. 100 (THURSTRON et coll., 1957) et ensuite marquée à l'iode radioactif selon la technique de FRANCIS et coll. (1951). Le dosage des anticorps contenus dans la fraction gamma-globulinique après ces traitements montrait que les anticorps constituaient 10 à 14 p. 100 de l'ensemble des gamma-globulines.

Après la sensibilisation avec des concentrations adéquates d'anticorps et une durée d'incubation en général d'une heure, on portait les fragments d'intestin dans un cristal creux à scintillation. La mesure de la radioactivité du fragment permettait ainsi de calculer la quantité de globulines totales adsorbée sur l'intestin au cours de la sensibilisation. Les organes étaient ensuite replacés dans la solution de Tyrode, qui était changée très fréquemment. A des intervalles réguliers, les organes étaient placés dans le cristal creux afin de doser les quantités de gamma-globulines résiduelles. Simultanément, des fragments d'intestin sensibilisés et lavés dans les mêmes conditions étaient mis en contact avec l'antigène et leur réaction anaphylactique enregistrée et comparée à la réaction obtenue immédiatement après la sensibilisation.

Les lavages étaient effectués pendant les premières 4 heures à la température de 38°C

et ensuite à la température de 5°C. D'autres expériences de lavage ont été effectuées sur des fragments d'intestins prélevés chez ces cobayes sensibilisés passivement *in vivo* avec 50 µg N d'anticorps radiomarqués injectés par voie intraveineuse 48 h avant le sacrifice. Une dernière série d'expériences avait pour objet d'étudier les effets du lavage de fragments d'intestin prélevés sur des cobayes activement sensibilisés avec une injection sous-cutanée d'ovalbumine précipitée à l'alun, 12 jours auparavant.

b) *L'action désensibilisante des gamma-globulines a été étudiée de la manière suivante* : des fragments d'intestin prélevés chez le même animal ont été sensibilisés *in vitro* après incubation dans une solution de Tyrode contenant 2 µg N/ml d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin, pendant 1 h ; la sensibilisation passive *in vivo* a été induite chez des cobayes normaux par une injection intraveineuse de 50 µg N d'anticorps, du même immun-sérum ; 48 h plus tard, les animaux ont été sacrifiés et leur iléon prélevé.

Les fragments d'intestin ainsi sensibilisés *in vitro* ou *in vivo*, ont été ensuite placés ou bien dans des solutions de gamma-globulines à différentes concentrations pendant 1 h, ou bien dans une solution de Tyrode, pendant le même temps.

c) *L'action de CO₂ sur le processus de sensibilisation a été étudiée* sur des fragments d'intestin qui ont été placés pendant, avant ou après la sensibilisation, dans du liquide de Tyrode dans lequel on fait barboter du CO₂ pur, ou bien de l'air. Le CO₂ fait baisser rapidement le pH de ce milieu de 8,2 à 6,6. Dans quelques expériences, nous avons diminué la concentration du NaHCO₃ du liquide de Tyrode de 1 g/l à 0,125 g/l. Le barbotage de CO₂ dans cette solution produit une baisse du pH à 5,8.

RÉSULTATS

1. — Effet de lavages prolongés sur l'importance de la réaction anaphylactique.

a) LAVAGE DES ORGANES SENSIBILISÉS PASSIVEMENT *in vitro*.

Les lavages répétés avec la solution de Tyrode à 38°C entraînent une diminution progressive des gamma-globulines et des anticorps adsorbés sur les fragments d'intestin sensibilisés *in vitro*. La quantité totale des globulines décroît rapidement au début, plus lentement ensuite, pour atteindre 40 p. 100 de son taux initial après 2 h et 32 p. 100 environ après 4 h de lavage (fig. 1). La décroissance de la radioactivité des tissus se poursuit lorsque les lavages sont effectués ensuite à la température de 5°C ; ainsi, après 24 h de lavage, 27 p. 100 et après 48 h, 21 p. 100 des globulines totales restent encore adsorbées sur les organes sensibilisés.

Que devient la réaction anaphylactique dans ces conditions ?

Après 2 h de lavage, et malgré la diminution de plus de la moitié des globulines et des anticorps adsorbés sur les organes sensibilisés, la contraction anaphylactique reste identique à celle des fragments non lavés. Cependant, si l'on prolonge davantage le lavage, la contraction anaphylactique commence à décroître très progressivement. Cette diminution commence à peine à paraître après 4 h de lavage, mais elle est évidente après 24 et 48 h, où elle se trouve diminuée de plus de la moitié (45 p. 100 et 32 p. 100 respectivement de la contraction initiale) (fig. 1).

b) LAVAGE DES ORGANES SENSIBILISÉS PASSIVEMENT *in vivo*.

La désorption des gamma-globulines et des anticorps des organes sensibilisés passivement *in vivo* présente un aspect similaire. Rapide au début, elle progresse ensuite plus lentement à mesure que les lavages se poursuivent. Après 48 h de lavage, 18 p. 100 environ des gamma-globulines demeurent adsorbées sur l'intestin (fig. 1).

La diminution de l'importance de la réaction anaphylactique suit les mêmes modalités qu'après sensibilisation *in vitro* : nulle après 2 h de lavage et peu importante après 4 h, elle devient manifeste après 24 h et 48 h de lavage.

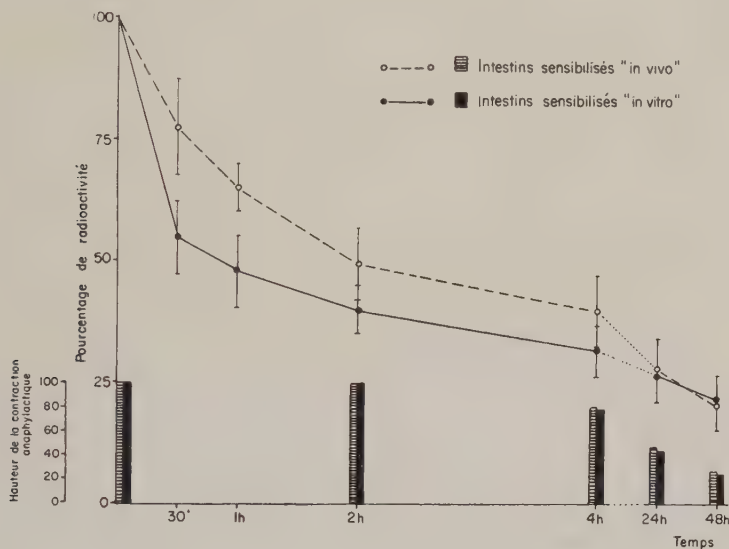


FIG. 1. — *En haut* : cinétique de la désorption des gamma-globulines adsorbées sur des fragments d'intestin de Cobaye, au cours de la sensibilisation passive *in vitro* ou *in vivo* sous l'influence des lavages prolongés. — *En bas* : évolution de l'importance de la réaction anaphylactique sous l'effet des lavages prolongés. Abscisses : temps de lavage. — Ordonnées : pourcentages de radioactivité ou de la contraction anaphylactique.

Il résulte de ces expériences que la désorption des globulines s'effectue à une cadence rapide pendant les deux premières heures, où 50 p. 100 environ des globulines adsorbées sont éluées ; dans une seconde phase la désorption est plus lente : après 48 h de lavage, ne sont élués que 30 p. 100 supplémentaires des globulines totales. En comparant la cinétique de la désorption des globulines avec celle de la diminution de l'importance de la réaction anaphylactique, nous voyons que la désensibilisation des organes est sensiblement parallèle à la désorption des globulines au cours de sa phase lente. Il est probable que la partie des gamma-globulines qui se désorbe lentement et difficilement, est celle qui intéresse la sensibilisation.

Devant cette allure de la cinétique de la désorption des gamma-globulines et des anticorps, nous nous sommes demandé si cette désorption lente ne reflète

pas une affinité particulière de ces protéines pour les tissus, ou s'il ne s'agit pas d'une propriété qui est commune à toutes les protéines. Ceci nous a amené à étudier comparativement la désorption des protéines en utilisant d'une part les gamma-globulines de Lapin, et, d'autre part, la sérum-albumine de Bœuf.

c) ADSORPTION DES PROTÉINES SUR L'INTESTIN ISOLÉ DE COBAYE
ET LEUR DÉSORPTION PAR DES LAVAGES PROLONGÉS.

Pour l'étude comparative de l'adsorption des gamma-globulines de Lapin et de la sérum-albumine de Bœuf sur l'intestin de Cobaye, nous avons incubé

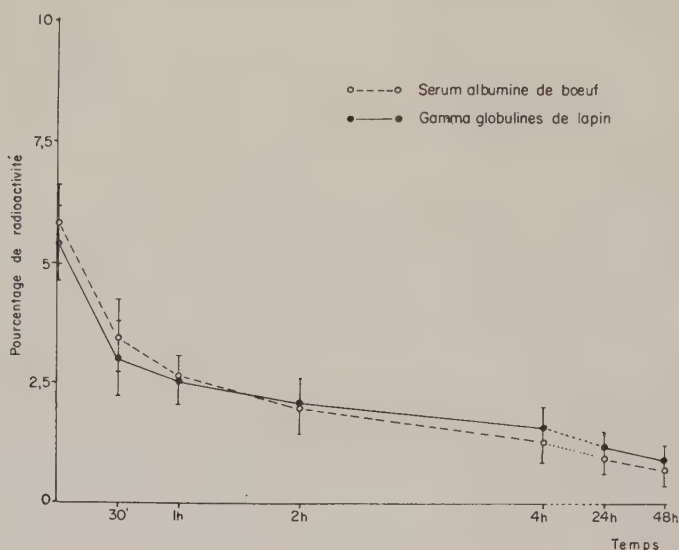


FIG. 2. — Cinétique de la désorption de la sérum-albumine de Bœuf et des gamma-globulines de Lapin adsorbées sur des fragments d'intestin de Cobaye, au cours de l'incubation *in vitro* dans des solutions contenant 50 $\mu\text{g N/ml}$ de ces protéines.

pendant 60 mn des fragments d'intestin dans des solutions contenant 50 $\mu\text{g N/ml}$ soit de gamma-globulines de Lapin, soit de sérum-albumine de Bœuf, radiomarquées à l'I¹³¹. Après la fin de cette période d'incubation, nous avons soumis ces fragments à des lavages répétés de la même manière que précédemment.

Sur la figure 2 sont rapportés les résultats de cette étude : à la fin de la période d'incubation, les organes ont adsorbé, par gramme d'organe, sensiblement la même quantité de l'une ou de l'autre protéine, exprimée en pourcentage de la concentration des protéines dans le milieu d'incubation. Leur désorption au cours du lavage est également similaire. Ainsi, après 2 h de lavage, à la température de 38°C, environ la moitié des protéines adsorbées sur l'intestin a été éluée. Après 48 h de lavage, les organes contiennent encore 15 à 20 p. 100 de la quantité maximale de protéines adsorbées.

Il apparaît, d'après ces résultats, que l'adsorption sur les tissus isolés *in vitro*

de ces deux protéines hétérogènes, et leur désorption par des lavages prolongés, suivent la même cinétique. Il n'y a donc pas de raison de supposer que les gamma-globulines de Lapin aient une affinité particulière pour les tissus du Cobaye.

d) LAVAGE DES ORGANES DE COBAYES SENSIBILISÉS ACTIVEMENT.

Au cours des expériences précédentes nous avons étudié les modalités de désorption des gamma-globulines et des anticorps hétérologues adsorbés sur des fragments d'intestin. Parallèlement nous avons étudié la désensibilisation par des lavages prolongés de fragments d'intestin sensibilisés passivement *in vitro* ou *in vivo*.

Une désensibilisation similaire des organes est-elle possible lorsque le Cobaye est sensibilisé activement, c'est-à-dire par ses propres anticorps ?

Pour étudier ce problème nous avons sensibilisé activement des cobayes, avec une injection sous-cutanée de 5 mg d'ovalbumine précipitée à l'alun. Les cobayes sont sacrifiés 12 jours après cette injection unique. Il est en effet nécessaire que les animaux soient moyennement sensibilisés, si l'on veut suivre quantitativement l'évolution du degré de sensibilisation des organes.

Immédiatement après le sacrifice on prélève l'intestin que l'on divise en plusieurs fragments. Sur quelques-uns de ces fragments on fait la réaction anaphylactique qui est régulièrement positive. Dans ces conditions de sensibilisation, la contraction anaphylactique est d'intensité moyenne, facile à évaluer quantitativement en équivalents d'histamine.

Les autres fragments des intestins des cobayes activement sensibilisés, sont placés dans une solution de Tyrode, et lavés suivant les mêmes modalités : pendant 24 et 48 h à la température de 5°C.

Les résultats de ces expériences sont rapportés sur le tableau I. Nous pouvons constater que le lavage prolongé entraîne une diminution progressive de l'importance de la réaction anaphylactique. Par rapport à la réaction initiale, la contraction des fragments lavés est diminuée d'un tiers environ après 24 h de lavage et de la moitié, en moyenne après 48 h.

Ces résultats confirment les expériences du lavage des gamma-globulines normalement présentes dans l'intestin de Cobaye rapportées précédemment (LIACOPOULOS, 1962 *b*). Les deux groupes d'expériences montrent que le lavage prolongé des fragments d'intestins entraîne une diminution des gamma-globulines ou des anticorps autologues présents dans l'iléon de Cobaye.

2. — Action désensibilisante des gamma-globulines non spécifiques.

Nous avons montré dans un précédent article (LIACOPOULOS, 1962 *b*) que les gamma-globulines non spécifiques interfèrent avec les anticorps au cours du processus de la sensibilisation. De cette interférence résulte une diminution de la vitesse de sensibilisation, proportionnelle à la concentration des gamma-globulines dans le milieu d'incubation. Cette observation nous a amené à étudier l'effet

des gamma-globulines non spécifiques sur une sensibilisation déjà établie. Un travail préliminaire nous a, en effet, montré qu'un tissu passivement sensibilisé *in vitro* peut être entièrement désensibilisé après contact, de durée convenable, avec une concentration suffisante de gamma-globulines normales de Lapin (HALPERN et coll., 1959 a).

TABLEAU I. — Désensibilisation des fragments d'intestin sensibilisés activement (1) après lavages prolongés dans le liquide de Tyrode.

Exp.	Contraction anaphyl. initiale	Contraction anaphylactique après lavage de :		
		4 h à 38°C	24 h à 5° C	48 h à 5° C
1	0,2		0,2	0,17
	0,2		0,3	0,15
2	0,3	0,2	0,1	
	0,3	0,3	0,1	
3	0,06			
	0,05		0,05	0,03
	0,12		0,15	0,03
	0,06			
4	0,2		0,17	0,08
	0,3	0,25	0,12	0,07
5	0,3		0,22	0,13 0,075
6	0,2	0,17		0,1
	0,2	0,2		0,1 0,06
7	0,2			
	0,2	0,15	0,1	0,08
	0,17	0,2	0,06	0,06
	0,2		0,06	0,06

(1) Les intestins ont été prélevés chez des cobayes sensibilisés activement par injection de 5 mg d'ovalbumine précipitée à l'alun, 12 jours auparavant.

L'importance de la contraction anaphylactique est exprimée en équivalents d'histamine (bi-chlorhydrate, µg/ml).

Ce travail a été confirmé par MONGAR et SCHILD (1960) qui ont postulé, en outre, que le traitement avec une solution de gamma-globulines permet de désensibiliser aisément les tissus sensibilisés passivement *in vitro* ou *in vivo* pendant une ou deux heures, mais plus difficilement lorsque la période de sensibilisation a été

plus longue. Et lorsque les organes ont été prélevés chez des animaux sensibilisés activement, le traitement avec les gamma-globulines ne provoque pas une désensibilisation.

Nous avons continué nos recherches sur l'action désensibilisante des gamma-globulines des différentes espèces animales avec des organes sensibilisés *in vitro* ou bien avec des organes provenant de cobayes sensibilisés passivement ou activement *in vivo*.

a) DÉSENSIBILISATION DES ORGANES SENSIBILISÉS PASSIVEMENT *in vitro* OU *in vivo* AVEC DES ANTICORPS DE LAPIN.

Les organes sensibilisés placés dans les solutions des gamma-globulines présentent, à la fin de ce traitement, une diminution nette de la réaction anaphylactique par rapport aux témoins.

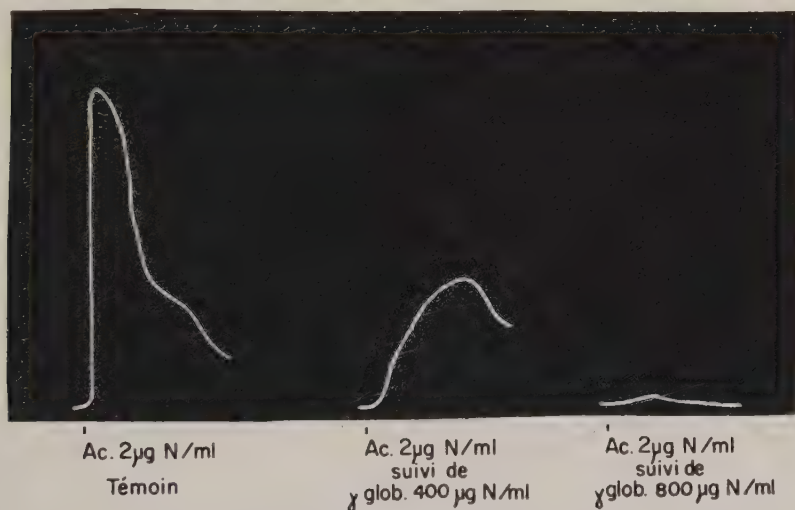


FIG. 3. — Action des gamma-globulines non spécifiques de Lapin, sur des fragments d'intestin de Cobaye préalablement sensibilisés avec $2\text{ }\mu\text{g N/ml}$ d'anticorps anti-ovalbumine de Lapin pendant 1 h. L'incubation dans la solution contenant les gamma-globulines aux concentrations indiquées est de la même durée (1 h).

L'effet désensibilisant des gamma-globulines normales de Lapin est proportionnel à leur concentration (fig. 3). Pour supprimer entièrement la contraction anaphylactique des fragments sensibilisés *in vitro* dans les conditions citées, il est nécessaire d'employer une concentration de gamma-globulines de $800\text{ }\mu\text{g N/ml}$. Avec des concentrations de gamma-globulines moins fortes (de $200\text{ }\mu\text{g N/ml}$ ou de $400\text{ }\mu\text{g N/ml}$) la désensibilisation obtenue n'est que partielle.

La désensibilisation déterminée par l'incubation des organes sensibilisés avec les gamma-globulines de Lapin semble être définitive puisque le lavage avec du liquide de Tyrode pendant 4 heures à la température de 38°C ne restaure nullement la réaction anaphylactique. Par ailleurs, le contact des fragments d'intestin

avec une concentration désensibilisante de gamma-globulines avant la sensibilisation inhibe cette dernière. Mais cette inhibition est provisoire : le séjour de ces fragments dans une solution de Tyrode fréquemment renouvelée, à la température de 38°C, pendant 3 à 4 h, leur restitue entièrement leur aptitude à se sensibiliser.

Cette propriété des gamma-globulines normales de Lapin de désensibiliser un organe isolé de Cobaye n'est pas exclusive. Les relations quantitatives qui relient l'activité des gamma-globulines des différentes espèces animales sur le processus de sensibilisation, étudiées précédemment (LIACOPOULOS, 1962 *b*), se retrouvent ici. D'après les données du tableau II, les organes sensibilisés *in vitro* avec 2 µg N d'anticorps pendant 60 mn se désensibilisent régulièrement après incubation de la même durée dans des solutions des gamma-globulines de Lapin, de Cobaye et de Cheval. La concentration efficace des globulines de Lapin est de 800 µg N de globulines par ml, tandis que celle des globulines de Cobaye est de 1 500 µg N/ml et celle des globulines de Cheval 3 000 µg N/ml.

Ces concentrations de gamma-globulines des trois espèces animales sont également capables, après une heure d'incubation, de désensibiliser l'iléon des cobayes sensibilisés passivement *in vivo* (tableau II), après une injection intraveineuse d'anticorps 24 h auparavant.

TABLEAU II. — Désensibilisation des fragments d'intestins sensibilisés passivement *in vivo* (1) ou *in vitro* (2) après incubation (3) avec des gammaglobulines normales de différentes espèces animales.

Sensibilisation	Exp.	Contraction anaph. de réf. (4)	Contraction anaphylactique après incubation dans :					
			glob. Lapin µg N/ml		glob. Cobaye µg N/ml		glob. Cheval µg N/ml	
			400	800	800	1 500	1 500	3 000
<i>in vitro</i>	1	0,2	0,03	0,01	0,2	0,015	0,1	0,005
	2	0,15	0,03	0,01		0,01	0,08	0,015
	3	0,2	0,00	0,00	0,08	0,015		0,015
	4	0,15		0,00	0,06	0,005	0,12	0,01
	5	0,15	0,05	0,01	0,1	0,005	0,07	0,005
	6	0,13	0,045	0,005	0,08	0,005	0,055	0,005
<i>in vivo</i>	1	0,12		0,012		0,015		0,02
	2	0,09		0,001		0,005		0,015
	3	0,2		0,015				0,005
		0,1		0,005		0,01		0,01

(1) Sensibilisation par injection I. V. de 50 g N d'anticorps à des cobayes normaux 48 h avant le sacrifice.

(2) Sensibilisation dans une solution contenant 2 g N/ml d'anticorps de Lapin pendant 1 heure.

(3) Incubation pendant 1 heure à 38°C.

(4) Fragments d'intestins sensibilisés dans les mêmes conditions et incubés dans une solution de Tyrode pendant 1 heure.

L'importance des contractions anaphylactiques est exprimée en équivalents d'histamine (bichlorhydrate, µg/ml).

On peut obtenir des désensibilisations du même ordre avec des concentrations de gamma-globulines moins élevées à condition que l'on prolonge la durée d'incubation des organes sensibilisés.

Ainsi quels que soient le mode et la durée de la sensibilisation passive avec des anticorps de Lapin, la désensibilisation peut être réalisée par incubation dans des solutions des gamma-globulines de différentes espèces animales. Signalons que dans le cas des sensibilisations avec des anticorps de Lapin, ce sont les gamma-globulines normales de Lapin qui se sont montrées les plus actives.

b) DÉSENSIBILISATION DES ORGANES DE COBAYES SENSIBILISÉS ACTIVEMENT.

L'étude de la désensibilisation des organes prélevés sur des cobayes sensibilisés activement par des gamma-globulines normales, est d'un intérêt particulier. En

TABLEAU III. — *Désensibilisation des fragments d'intestins sensibilisés activement (1) après incubation (2) avec des gamma-globulines normales de différentes espèces animales.*

Exp.	Contraction anaph. de réf. (3)	Contraction anaphylactique après incubation dans :					
		glob. Cobaye μg N/ml		glob. Lapin μg N/ml		glob. Cheval μg N/ml	
		1000	2000	1000	2000	3000	4000
1	0,2 0,3	0,17	0,02	0,12	0,04		0,03
2	0,3 0,3 0,3 0,3	0,17 0,05 0,1		0,12 0,3 0,3			
3	0,3 0,3	0,03 0,02		0,1 0,1		0,15 0,08	
4	0,12 0,12	0,02 0,02		0,1 0,15	0,01 0,01	0,08 0,04	0,05
5	0,13 0,075	0,02 0,02			0,01 0,03		
6	0,15 0,15	0,15 0,15	0,04 0,03	0,12 0,1	0,07 0,05	0,1 0,08	0,03 0,02

(1) Les intestins ont été prélevés chez des cobayes sensibilisés activement par injection de 5 mg d'ovalbumine précipitée avec de l'alun.

(2) Incubation de 1 heure à 38°C.

(3) Des fragments des mêmes intestins incubés pendant 1 heure dans une solution de Tyrode.

L'importance de la contraction anaphylactique est exprimée en équivalents d'histamine (bichlorhydrate, μg/ml).

effet dans ce cas la sensibilisation des tissus est réalisée par les propres anticorps de l'animal.

La sensibilisation active a été effectuée par une injection sous-cutanée de 5 mg d'ovalbumine précipitée à l'alun. Les animaux furent sacrifiés 12 jours plus tard et leur iléon prélevé et traité comme au cours des expériences précédentes. Dans ces conditions nous obtenons une réaction de SCHULTZ-DALE sub-maximale que nous pouvions donc mesurer, car une contraction anaphylactique maximale, ne nous aurait pas permis de faire des évaluations quantitatives.

Les concentrations de gamma-globulines normales des trois espèces animales employées (Cobaye, Lapin et Cheval) ont été ici plus élevées, car ces réactions anaphylactiques initiales étaient régulièrement plus importantes que lors des expériences précédentes. Mais les résultats obtenus sont du même ordre : l'incubation des fragments d'intestin sensibilisés activement, dans des solutions de gamma-globulines normales, pendant 1 h détermine régulièrement une diminution très importante de la réaction anaphylactique (tableau III).

3. — Action de l'anhydride carbonique.

Un autre facteur, qui est capable de modifier le processus de sensibilisation est le CO_2 . Lorsque, dans le milieu de la sensibilisation, on fait barboter du CO_2 à la place de l'air, on obtient les modifications du $p\text{H}$ précédemment décrites.

Dans ces conditions, l'abaissement du $p\text{H}$ du milieu de sensibilisation à 6,6 provoque une diminution importante de l'intensité de sensibilisation, et à $p\text{H}$ 5,8 la sensibilisation avec la même concentration d'anticorps, et la même période de contact, est entièrement inhibée (fig. 4). Mais cette inhibition n'est pas absolue : une augmentation de la concentration d'anticorps peut contrebalancer l'effet inhibiteur du CO_2 .

Une série d'expériences a été ainsi entreprise pour déterminer la concentration d'anticorps qui produit la même contraction anaphylactique après la même durée d'incubation dans des solutions de Tyrode aux différents $p\text{H}$ mentionnés. Ces expériences montrent que lorsque le $p\text{H}$ du milieu de sensibilisation baisse de 8,2 à 5,8, il faut augmenter de 20 fois la concentration en anticorps pour obtenir la même contraction anaphylactique (fig. 5).

HALPERN et BINAGHI (1959 *b*) ont rapporté que le CO_2 peut traverser sélectivement une membrane vivante quel que soit le $p\text{H}$ de la solution extérieure. Nous nous sommes ainsi demandé si l'effet inhibiteur est dû à une action spécifique de CO_2 qui s'exercerait indépendamment du $p\text{H}$ de la solution. Ces expériences ont été négatives : lorsque, malgré le barbotage de CO_2 , le $p\text{H}$ de la solution est maintenu à la valeur de 8,2 par une addition d'une petite quantité de NaHCO_3 , aucun effet inhibiteur n'apparaît. Il y aurait donc un antagonisme entre le CO_2 (ou plutôt sa forme hydratée, H_2CO_3) et l'ion HCO_3^- et le résultat final dépendrait de la concentration relative de ces deux facteurs.

Quel est le mode d'action du CO_2 ? HALPERN et coll. (1959) ont démontré

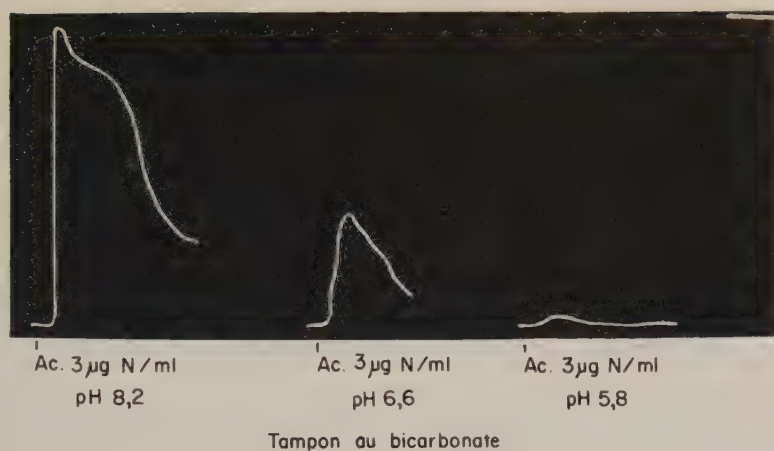


FIG. 4. — Influence du CO_2 sur l'importance de la sensibilisation en fonction du pH du milieu. Dans tous les cas la sensibilisation a été produite avec la même concentration d'anticorps ($3 \mu\text{g N/ml}$) et la durée d'incubation est d'1 heure.

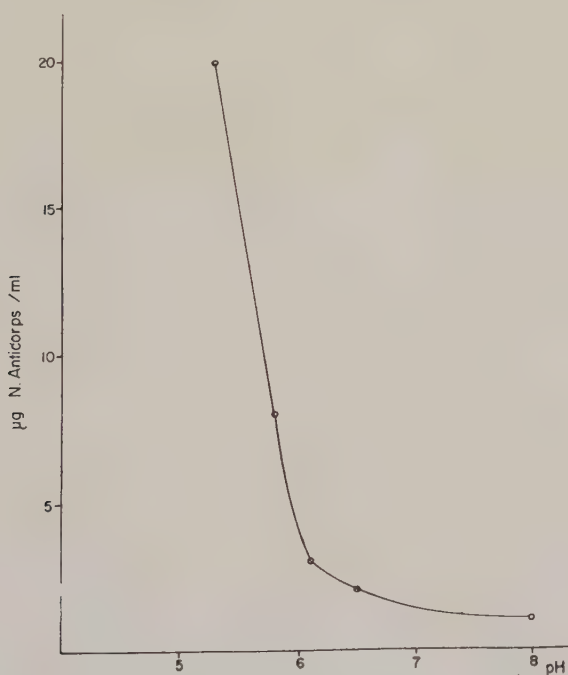


FIG. 5. — Relation entre la concentration d'anticorps et le pH de la solution de sensibilisation nécessaires pour obtenir une contraction anaphylactique déterminée. Les différentes valeurs du pH sont obtenues par barbotage de CO_2 dans les solutions de sensibilisation contenant des quantités variables de NaHCO_3 .

que le CO_2 inhibe, proportionnellement au pH assuré par le barbotage de CO_2 dans du Tyrode contenant différentes concentrations de NaHCO_3 , l'action de l'histamine et de l'ocytocine dans le muscle lisse, et aussi la contraction anaphylac-

tique d'un organe préalablement sensibilisé. Il y a lieu de se demander ainsi si l'action de CO_2 rapportée ci-dessus n'est en fait qu'une inhibition de l'action de l'histamine, libérée au cours de la réaction anaphylactique. Cette hypothèse est à exclure puisque, dans chaque expérience, l'addition de l'antigène ne se faisait que lorsque l'organe sensibilisé en présence du CO_2 avait récupéré sa réactivité normale à l'histamine, après un séjour dans une solution de Tyrode normalement oxygénée.

On peut donc présumer que l'action du CO_2 s'exerce ou bien sur le processus de la sensibilisation tissulaire ou bien sur la réaction anaphylactique proprement dite qui, déclenchée par le conflit antigène-anticorps, aboutit, par une série de réactions vraisemblablement enzymatiques, à la libération d'histamine.

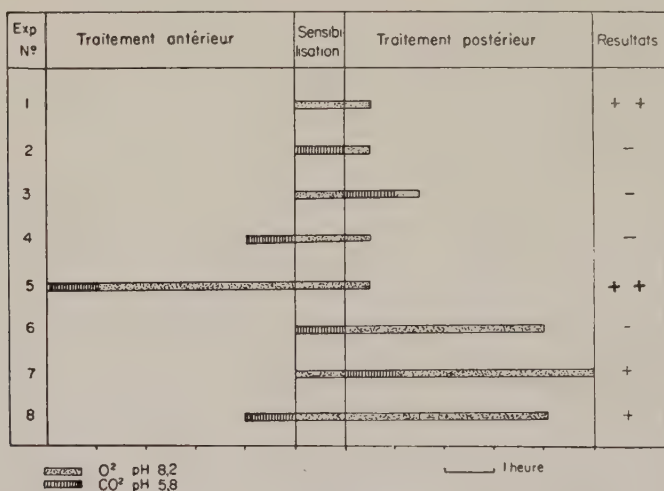


FIG. 6. — Représentation schématique de l'action de l'anhydride carbonique sur la sensibilisation passive *in vitro* des organes isolés.

Pour préciser davantage le point d'impact du CO_2 nous avons entrepris une série d'expériences qui sont schématiquement représentées sur la figure 6. D'après ces expériences, un traitement au CO_2 à pH 5,8, qu'il ait lieu avant, pendant ou après la période de sensibilisation, inhibe la réaction anaphylactique (exp. nos 2, 3 et 4) d'un fragment d'intestin ayant récupéré sa réactivité normale à l'histamine. Cette action inhibitrice est réversible : un intestin traité au CO_2 à pH 5,8 pendant une heure, replacé ensuite dans une solution de Tyrode et oxygéné normalement, retrouve, 4 h après, son aptitude à se sensibiliser (exp. n° 5) avec la même intensité qu'un intestin n'ayant pas subi de traitement (exp. de contrôle n° 1).

Ayant en vue cette lente réversibilité de l'effet du CO_2 nous avons réalisé à nouveau les expériences précédentes, mais en prenant la précaution de replacer l'intestin après la fin du traitement au CO_2 dans un milieu normalement oxygéné pendant 4 h, avant d'y introduire l'antigène et de déclencher la réaction anaphylactique (fig. 6, exp. nos 6, 7, 8). Voici les résultats obtenus : si le traitement avec le CO_2 à pH 5,8 a lieu pendant la période de la sensibilisation, celle-ci est

définitivement inhibée ; s'il a lieu avant cette période, la sensibilisation est partiellement inhibée ; si ce traitement a lieu après la période de sensibilisation, une désensibilisation partielle se produit.

Ainsi l'effet du CO_2 semble s'exercer, mais d'une façon réversible, sur le processus de libération d'histamine puisqu'un organe sensibilisé et soumis à l'action du CO_2 ne répond pas à l'addition de l'antigène spécifique pendant quelque temps, mais réagit après 4 h d'oxygénation (fig. 6, exp. n^{os} 3 et 7). Cependant cet effet du CO_2 doit s'exercer aussi sur le processus de sensibilisation puisque l'incubation de l'organe avec des anticorps dans un milieu contenant du CO_2 ne donne pas lieu à une réaction anaphylactique (exp. n^{os} 2 et 6) et que dans le cas où le traitement est fait après la sensibilisation il se produit une désensibilisation partielle.

Le mécanisme d'action du CO_2 nous échappe. Cependant, divers auteurs (ARVANITAKI et CHALAZONITIS, 1954 ; CALDWELL, 1958) ont montré que le CO_2 est capable de modifier le pH intracellulaire, ou (HALPERN et BINAGHI, 1959 *b*) de passer à travers des membranes vivantes et d'abaisser le pH de la solution intérieure. Une hypothèse pourrait être avancée, que le CO_2 traversant la membrane de la cellule abaisse le pH du milieu intracellulaire, ce qui affecterait les structures cellulaires qui interviennent dans la sensibilisation et la réaction anaphylactique. Mais cette hypothèse ne saurait suffire pour expliquer l'action du O_2 puisque, comme nous l'avons vu, celle-ci ne se manifeste que lorsque le pH du milieu extérieur est abaissé par diminution de la concentration en NaHCO_3 . Il apparaît ainsi que l'action du CO_2 dépend non de la concentration absolue en CO_2 (sous la forme de H_2CO_3) mais plutôt du rapport $\text{H}_2\text{CO}_3/\text{HCO}_3^-$.

DISCUSSION

Sur le problème fondamental de la réversibilité de la sensibilisation, nos expériences apportent quelques renseignements intéressants. Nous avons vu que, sous l'effet de différents traitements, mécaniques comme le lavage prolongé, ou physico-chimiques comme l'incubation des tissus sensibilisés avec des gammaglobulines non spécifiques, il peut se produire une désensibilisation partielle ou totale.

La diminution de la contraction anaphylactique obtenue par les lavages prolongés est en réalité peu importante, puisque, après 24 h de lavage, cette contraction est diminuée de 55 p. 100 et après 48 h de 68 p. 100 environ de la réaction initiale. Elle est néanmoins significative. Elle est, en effet, parallèle à la désorption des gamma-globulines et des anticorps, si l'on ne tient pas compte de la phase initiale de décroissance rapide. Ainsi que nous l'avons constaté, en étudiant la cinétique de la désorption des protéines par des lavages répétés, on peut admettre que les protéines se trouvent fixées sur les tissus d'une manière réversible. Sous l'effet des lavages les 50 p. 100 environ des globulines se désorbent rapidement au cours des 2 premières heures. Les autres 50 p. 100 se détachent bien plus lentement. Il est probable que le processus de sensibilisation est conditionné par la partie des gamma-globulines ou anticorps qui est la plus difficile à désorber.

Il est donc raisonnable de comparer les modifications de la sensibilisation

anaphylactique au cours des lavages avec celles de la désorption des globulines, en prenant comme point de départ le début de la phase de désorption lente, c'est-à-dire 2 h après le début des lavages. Dans ces conditions, on trouve, 24 h après, une diminution de la teneur en tissu en globulines de 50 p. 100 et, après 48 h, une diminution de 65 p. 100 environ. Pendant ce temps et avec les mêmes lavages, la contraction anaphylactique diminue de 55 p. 100 et de 68 p. 100 respectivement de sa valeur initiale (cf. fig. 1).

Il est intéressant de signaler que la cinétique de désorption des globulines et celle de la désensibilisation sont similaires, que la sensibilisation ait eu lieu *in vitro* ou *in vivo*.

Cette diminution de l'intensité de la réaction anaphylactique de l'organe sensibilisé après lavage n'est pas due à une modification de la sensibilité du tissu car sa réactivité à l'histamine et à l'anaphylatoxine demeure sans changement et sa capacité de réagir à l'anaphylaxie lorsque la sensibilisation est effectuée après le lavage, ainsi que nous l'avons vu (LIACOPOULOS, 1962 *b*), augmente de 3 à 4 fois.

Par ailleurs, l'adsorption et la désorption de la sérum-albumine de Bœuf se font suivant les mêmes modalités que les gamma-globulines de Lapin. Pourtant, ainsi que l'ont montré HUMPHREY et MOTA (1959) le traitement des tissus de Cobaye avec la sérum-albumine de Bœuf ne permet pas de produire une anaphylaxie renversée. Ces mêmes auteurs ont également montré que les gamma-globulines de Cheval s'adsorbent et se désorbent sur les tissus de Cobaye suivant les mêmes modalités que les gamma-globulines de Lapin. Cependant les gamma-globulines de Cheval ne sensibilisent pas le Cobaye. Ainsi la lenteur avec laquelle s'effectue la désorption des gamma-globulines de Lapin des tissus du Cobaye ne doit pas être attribuée à une affinité particulière de ces protéines pour les tissus du Cobaye. Il s'agit là apparemment d'une propriété commune à toutes les protéines.

Nos résultats, concernant les modifications de la réaction anaphylactique après des lavages effectués pendant une courte période, sont en accord avec ceux de DALE (1913), de FREUND (1927) et de nombreux autres auteurs qui n'ont pas pu observer une diminution de la réaction anaphylactique après la perfusion d'organes sensibilisés, pendant une ou deux heures.

Mais, nous avons vu qu'en continuant les lavages plus longtemps c'est seulement après 4 h qu'une diminution de la réaction anaphylactique commence à se manifester. Il faut, ainsi que l'ont prévu FREUND et WHITNEY (1928), prolonger le lavage pendant 24 h et plus pour que cette diminution s'affirme et devienne nette, ce qui est techniquement irréalisable pour les perfusions *in situ*. Par ailleurs, il n'est possible d'enregistrer cette diminution que si la réaction anaphylactique est quantitativement évaluée. Une réaction anaphylactique très intense qui se sera traduite par une contraction maximale de l'organe isolé et qui sera par là même devenue non mesurable ne sera pas apparemment diminuée même par des lavages très prolongés. En effet l'élution de 50 p. 100 ou même plus d'anticorps ne donnera probablement pas lieu à une diminution correspondante de la réaction anaphylactique puisqu'il restera encore suffisamment des anticorps pour que la réponse reste maximale.

En mettant en parallèle les expériences relatives à la durée de l'anaphylaxie cutanée passive et les nôtres, nous constatons que les résultats sont similaires : nous avons vu qu'après 48 h de lavage la réaction anaphylactique est diminuée au tiers environ. OVARY et BIER (1953) ont montré qu'une diminution analogue de la réaction anaphylactique cutanée survient 48 h après l'injection intradermique d'une dose convenable (1 μ g d'azote) d'anticorps de Lapin chez le Cobaye. Avec des doses moindres, la réaction locale disparaît plus rapidement. De plus, ces auteurs ont montré que les anticorps injectés localement, à des doses de 0,3 à 3 μ g d'azote, diffusent du site de l'injection dans tout l'organisme, et il est possible de les déceler, 24 heures après l'injection à des endroits éloignés de la peau. Ces faits suggèrent qu'il existe un drainage continu, par la lymphe et la circulation, des anticorps injectés localement.

La diminution de la réaction anaphylactique à la suite de lavages prolongés se manifeste également lorsqu'on utilise des fragments d'intestins de cobayes sensibilisés activement. Ce fait s'observe régulièrement si la réaction anaphylactique initiale est submaximale. Nous avons vu précédemment (LIACOPOULOS, 1962 *b*) que les gamma-globulines de Cobaye normalement présentes dans l'iléon peuvent être éluées par un lavage prolongé. La diminution de la réaction anaphylactique à la suite d'un traitement similaire, montre que les anticorps de Cobaye, comme les gamma-globulines normales, sont entraînés par le liquide de lavage. La différence que nous avons observée entre la diminution de la réaction anaphylactique des organes sensibilisés passivement avec les anticorps de Lapin (diminution de 2/3 après 48 h de lavage) et celle des organes sensibilisés activement (diminution de la moitié) peut être attribuée soit à l'origine des anticorps (hétérologues dans le premier cas, autologues dans le second), soit à la plus grande durée de contact des anticorps, et par conséquent leur diffusion plus intime dans les tissus, dans le cas des cobayes sensibilisés activement.

Ce caractère des anticorps sensibilisants d'être essentiellement labiles, est confirmé par l'action désensibilisante des gamma-globulines non spécifiques. Celles-ci peuvent déterminer une désensibilisation totale lorsque le tissu est incubé pendant une heure dans une solution contenant une concentration suffisante de globulines (tableaux II et III). Ce fait a été également observé par MONGAR et SCHILD (1960), sur des tissus sensibilisés brièvement *in vitro*. Mais ils n'ont pas pu désensibiliser avec des globulines non spécifiques des tissus sensibilisés longuement *in vitro* et surtout des tissus sensibilisés *in vivo* passivement ou activement. Et ils concluent que le facteur principal qui détermine la réversibilité du processus de la sensibilisation est la durée de contact des tissus avec les anticorps.

A ces expériences nous pouvons objecter qu'elles ne tiennent pas compte des facteurs quantitatifs, au cours de la sensibilisation. Nous avons vu (LIACOPOULOS, 1962 *a*) que l'intensité de la sensibilisation, avec une concentration donnée d'anticorps, est fonction de la durée d'incubation du tissu dans le milieu de sensibilisation. Ceci suggère que la quantité d'anticorps qui pénètrent et sensibilisent le tissu augmente avec la durée de contact du tissu avec la solution contenant les anticorps. Cette hypothèse est en accord avec l'observation de FREUND (1927)

qu'après une injection intraveineuse chez des lapins d'un immunsérum homologue, les anticorps diffusent lentement dans les tissus (peau et utérus) et y atteignent leur taux maximal seulement après 17 à 24 h. Ainsi, dans les expériences de MONGAR et SCHILD (1960), l'inefficacité des globulines de Cobaye à désensibiliser les tissus peut être attribuée à la teneur très élevée en anticorps des tissus sensibilisés *in vivo* ou *in vitro*. En effet, dans nos expériences, nous avons toujours pris la précaution de produire des états de sensibilisation d'intensité moyenne, de manière à obtenir une réponse anaphylactique quantitativement mesurable. Pour la sensibilisation passive *in vivo*, nous avons injecté 50 μ g N d'anticorps de Lapin et nous avons obtenu des contractions anaphylactiques équivalentes à 0,1 μ g d'histamine (bichlorhydrate) par ml. MONGAR et SCHILD (1960) injectèrent 800 μ g N. Pour les sensibilisations actives, nous avons sacrifié les animaux 12 jours après l'injection de l'antigène, quand la sensibilisation est encore d'intensité moyenne. C'est ainsi que nous avons obtenu régulièrement une désensibilisation des tissus sensibilisés soit passivement *in vitro* ou *in vivo*, soit activement. Si ces auteurs n'ont pas pu obtenir une désensibilisation après le traitement avec les gamma-globulines sur des tissus longuement sensibilisés, ce serait à cause d'un large excès d'anticorps tissulaires plutôt qu'en raison d'un attachement plus solide des anticorps aux récepteurs cellulaires.

Le fait que les globulines de Cheval, qui ne sensibilisent pas les tissus du Cobaye (HUMPHREY, 1959), se montrent capables de désensibiliser les tissus sensibilisés par des anticorps de Lapin ou de Cobaye, quand elles sont employées à une concentration adéquate, s'inscrit contre la conception d'une liaison spécifique entre les anticorps sensibilisants et les cellules du Cobaye.

Quel est le mode d'action des gamma-globulines normales ?

BROCKLEHURST et coll. (1961) ont rapporté récemment que la désorption des anticorps se fait beaucoup plus rapidement lorsque le lavage est effectué avec une solution de gamma-globulines qu'avec une solution de Tyrode. Nous pouvons ainsi penser que l'incubation des organes sensibilisés avec des gamma-globulines normales des différentes espèces animales, provoque une désorption rapide des anticorps sensibilisants. Il est néanmoins possible que, en dehors de cette désorption, une inactivation des anticorps sensibilisants se produise par des interférences qu'exercent les gamma-globulines additionnées dans le milieu d'incubation en quantités élevées.

Il est difficile d'insérer dans cet ensemble de travaux les expériences effectuées avec l'anhydride carbonique. Nous avons vu qu'en faisant barboter ce produit dans le milieu de sensibilisation, on entrave cette dernière de telle manière qu'il faut augmenter de 20 fois la concentration en anticorps pour obtenir le même degré de sensibilisation. Si le traitement pour le CO_2 est pratiqué après la sensibilisation, une désensibilisation partielle se produit.

Le mode d'action de cette substance n'est pas clair. Si nous évoquons l'hypothèse que le CO_2 inhibe la sensibilisation par l'acidification du milieu intra-cellulaire qu'il provoque, selon l'observation de ARVANITAKI et CHALAZONITIS (1954) et de CALDWELL (1958), nous ne pouvons pas comprendre pourquoi le degré

d'inhibition de la sensibilisation est fonction du pH du milieu extérieur. En effet, HALPERN et BINAGHI (1959 *b*) ont montré que le CO_2 traverse les membranes vivantes et acidifie la solution intérieure indépendamment du pH de la solution extérieure.

Une analyse de l'action de CO_2 sur le processus de sensibilisation nous a montré qu'elle ne dépend pas de la concentration absolue de CO_2 (sous la forme de H_2CO_3) mais du rapport H_2CO_3/HCO_3^- . Or, l'action de l'histamine et de l'ocytocine est également influencée par le rapport H_2CO_3/HCO_3^- (HALPERN et coll., 1959 *c*) tandis que l'effet d'autres substances agissant sur la musculature lisse, comme l'acétylcholine, le KCl, etc., ou l'excitabilité électrique, n'est pas modifié.

Ainsi le mode d'action du CO_2 paraît assez complexe et il est difficile de l'expliquer sur la base de nos connaissances actuelles.

RÉSUMÉ

Divers traitements se sont montrés capables de désensibiliser des tissus isolés préalablement sensibilisés soit activement, soit passivement *in vitro* ou *in vivo*.

L'incubation des organes sensibilisés avec des gamma-globulines non spécifiques de Lapin, de Cobaye ou de Cheval, produit régulièrement une désensibilisation complète.

Les lavages prolongés, ainsi que l'incubation dans un milieu de survie saturé en anhydride carbonique, peuvent désensibiliser, au moins partiellement, un tissu sensibilisé.

Ces faits montrent que le processus de sensibilisation est essentiellement réversible.

SUMMARY

Passive Anaphylaxis *in vitro*.

V. — Desensitization of Sensitized Tissues.

It has been found possible by various methods to demonstrate the reversibility of the sensitization process by the desensitization of isolated tissues previously sensitized either actively or passively both *in vitro* or *in vivo*.

Incubation of sensitized organs with non-specific γ -globulins of the rabbit, guinea pig or horse, regularly produces complete desensitization.

Prolonged washing, or incubation in a medium saturated with carbon dioxide are able to produce at least a partial desensitization of sensitized tissues.

BIBLIOGRAPHIE

- ARVANITAKI, A. et CHALAZONITIS, N. (1954). Diffusibilité de l'anhydride carbonique dans l'axone géant, ses effets sur les vitesses de l'activité bioélectrique. *C. R. Soc. Biol. Paris*, **148**, 952-954.
- CALDWELL, P. C. (1958). Studies on the internal pH of large muscle and nerve fibres. *J. Physiol. London*, **149**, 22-62.

- CHANDLER, M. H., ROSENBERG, L. T. et FISCHER, E. E. (1959). Persistence of passively administered homologous and heterologous antibody in the guinea pig. *J. Immunol.*, **82**, 103-106.
- DALE, H. H. (1913). The anaphylactic reaction of plain muscle in the guinea pig. *J. Pharmacol.*, **4**, 167-223.
- DIXON, F. J., TALMAGE, D. W., MAURER, P. H. et DEICHMILLER, M. (1952). The half-life of homologous gamma-globulin (antibody) in several species. *J. exp. Med.*, **96**, 313-318.
- FRANCIS, G. E., MULLIGAN, W. et WORMALL, A. (1951). Labelling of proteins with iodine-131, sulphur-35 and phosphorus-32. *Nature, London*, **167**, 748-751.
- FREUND, J. (1927). Distribution of immune agglutinins in the serum and organs of rabbits. *J. Immunol.*, **14**, 101-110.
- FREUND, J. et WHITNEY, C. E. (1928). The distribution of antibodies in the serum and organs of rabbits. II. The effect of perfusion upon the antibody content of serum and organs. *J. Immunol.*, **15**, 369-380.
- HALPERN, B. N., LIACOPOULOS, P., LIACOPOULOS-BRIOT, M., BINAGHI, R. et VAN NEER, F. (1959 a). Patterns of *in vitro* sensitization of isolated smooth muscles tissues with precipitating antibody. *Immunology*, **2**, 351-362.
- HALPERN, B. N. et BINAGHI, R. (1959 b). Selective permeability of living tissues to carbonic acid. *Nature, London*, **183**, 1397-1398.
- HALPERN, B. N., BINAGHI, R., MAYER, M. et BUGNARD, C. (1959 c). Inhibition by CO₂ of the effect of histamine and oxytocine on smooth muscles. *Brit. J. Pharmacol.*, **14**, 19-25.
- HUMPHREY, J. H. et MOTA, I. (1959). The mechanism of anaphylaxis: observations on the failure of antibodies from certain species to sensitize guinea pig in direct and reversed passive anaphylaxis. *Immunology*, **2**, 19-30.
- LIACOPOULOS, P. (1961). L'anaphylaxie passive *in vitro*. — I. La méthode de sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **53**, 825-835.
- LIACOPOULOS, P. (1962 a). L'anaphylaxie passive *in vitro*. — III. Les modalités de la sensibilisation *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **54**, 501-516.
- LIACOPOULOS, P. (1962 b). L'anaphylaxie passive *in vitro*. — IV. Les phénomènes d'interférence entre anticorps et gamma-globulines non spécifiques au cours de la sensibilisation passive *in vitro*. *J. Physiol., Paris*, **54**, 517-533.
- MONGAR, J. L. et SCHILD, H. O. (1960). A study on the mechanism of passive sensitization. *J. Physiol., London*, **150**, 546-564.
- MUNOZ, J. et ANACKER, R. L. (1959). Anaphylaxis in *Bordetella pertussis* treated mice. — III. Passive cutaneous anaphylaxis. *J. Immunol.*, **83**, 640-644.
- OVARY, Z. et BIER, O. G. (1953). Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in the guinea pig and its relationship to the Arthus phenomenon. *J. Immunol.*, **71**, 6-11.
- OVARY, Z. (1958). Passive cutaneous anaphylaxis in the mouse. *J. Immunol.*, **81**, 355-357.
- RAPPPORT, D. Z. (1960). Antigen-antibody reactions in allergic human tissues. — II. Study of fluorescence technique of the localization of reagents in human skin and their relation to globulins. *J. exp. Path.*, **113**, 725-734.
- THURSTON, J. R., RHEIMS, M. S. et BUEHLER, E. V. (1957). A rapid method for recovering serologically active globulins by sodium sulfate precipitation. *J. Lab. clin. Med.*, **49**, 647-650.

VI. — Conclusions générales

1° La technique de sensibilisation passive *in vitro* des organes isolés de Cobaye, permet d'obtenir des réactions anaphylactiques en tout point semblables à celles produites après sensibilisation *in vivo* active ou passive.

2° A l'aide de cette technique nous avons pu étudier les modalités et le mécanisme du processus de sensibilisation.

3° Les deux facteurs essentiels qui déterminent l'intensité de la sensibilisation *in vitro*, sont la concentration des anticorps dans le milieu de survie et la durée de l'incubation des organes isolés dans ce milieu.

4° Ces deux facteurs sont reliés par une fonction qui peut être exprimée par la formul $C = f\left(\frac{1}{t^2}\right)$, c'est-à-dire que pour obtenir un degré de sensibilisation donné, la concentration d'anticorps nécessaire est fonction de l'inverse du carré du temps d'incubation.

5° Plusieurs facteurs se sont montrés capables d'influencer le processus de sensibilisation en modifiant sa vitesse : la température, la force ionique, le pH du milieu, l'urée, l'anhydride carbonique, la présence de gamma-globulines non-spécifiques homologues ou hétérologues.

6° Le processus de sensibilisation est essentiellement réversible. Des lavages prolongés, l'incubation avec des gamma-globulines non spécifiques, la saturation du milieu de survie par l'anhydride carbonique peuvent « désensibiliser » partiellement ou entièrement un organe sensibilisé soit passivement *in vitro*, soit activement ou passivement *in vivo*.

7° L'intensité de la réaction anaphylactique est proportionnelle à la quantité d'antigène seulement lorsque celle-ci est inférieure à certaines limites. Ces limites sont en rapport direct avec la concentration d'anticorps utilisés pour la sensibilisation, la durée d'incubation demeurant constante.

8° Une dose d'antigène liminaire souvent incapable de déclencher une réaction anaphylactique visible, peut néanmoins saturer la totalité des anticorps et désensibiliser l'organe à condition qu'elle reste en contact, suffisamment longtemps, avec l'organe sensibilisé. La durée nécessaire de ce contact est fonction directe de la concentration d'anticorps utilisée pour la sensibilisation.

9^o Qu'il s'agisse de la sensibilisation, du déclenchement de la réaction anaphylactique ou de la désensibilisation par des faibles quantités d'antigènes, la diffusion des molécules d'anticorps ou d'antigène dans le tissu isolé, joue un rôle essentiel au cours de l'anaphylaxie passive *in vitro*.

Vu :

Le Président :

Signé : P. MILLIEZ.

Vu :

Le Doyen,

Signé : L. BINET

Vu et Permis d'imprimer

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Signé : Jean SARRAILH.

